

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried

Abteilung Virusforschung

Leitung: Prof. Dr. Dr. P.H. Hofschneider

vorgelegt über

das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Mayr

INFEKTIONSMUSTER DER AKUTEN COXSACKIEVIRUS B3 INDUZIERTEN MYOKARDITIS VERGLEICHEND IM MAUSMODELL

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

ANITA MICHEL, GEB. SCHÖN

aus Zöschingen

München im ~~Oktober~~ 1988

1989



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554827_0051

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie

in Martinsried

Abteilung für Virusforschung

Leitung: Prof.Dr.Dr.P.H.Hofschneider

vorgelegt über

das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof.Dr.Dr.h.c.mult.A.Mayr

**Infektionsmuster der akuten Coxsackievirus B3-
Induzierten Myokarditis vergleichend im Mausmodell**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Anita Michel, geb. Schön

aus

Zöschingen

München im Oktober 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c.mult. A. Mayr

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. M.J. Forstner

Tag der Promotion: 24. Februar 1989

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 . EINLEITUNG	5
1.1 Cocksackievirus induzierte Myokarditis	6
1.2 <u>In situ</u> Hybridisierung in der Diagnose der viralen Myokarditis	7
1.3 Versuchstiermodelle zur Cocksackievirus B3 induzierten Myokarditis	9
1.4 Das Interferonsystem	10
1.4.1. Einteilung der Interferone	11
1.4.2. Wirkungen der Interferone	12
1.4.3. Einsatz der Interferone <u>in vivo</u>	15
2 . EIGENE UNTERSUCHUNGEN	16
2.1 Material	16
2.2 Methoden	21
2.2.1 Isolierung des rekombinanten Plasmides pCB3 M1	21

2.2.2	Isolierung der Fragmente Kpn I und Bam H I	22
2.2.3	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten durch Nick-Translation	27
2.2.4	Methode der <u>in situ</u> Hybridisierung	29
	Vorbereitungen zur <u>in situ</u> Hybridisierung	29
	Hybridisierung der Proben	31
	Autoradiographie der Hybridisierungsproben	33
2.2.5	Zellkultivierung	35
2.2.6	Rückisolierung von CVB3 aus dem Herzen infizierter Mäuse in konfluenten Verozellmonolayern	35
2.2.7	Erzeugung eines kardiotropen Virusstocks der "large-plaque" Variante von CVB3	36
	Passage von CVB3 in Mäuseherzen	36
	Plaque-Reinigung von CVB3	37
	Plaque-Test zum quantitativen Virusnachweis	37
2.2.8	Infektion von Versuchstieren mit CVB3	39
2.2.9	Gewinnung von Organproben aus infizierten Mäusen	39
2.2.10	ELISA zum Nachweis der murinen Antikörperproduktion gegen die Hüllproteine VP1, VP4/2/3 und Polymerase von CVB3	40

2.3 ERGEBNISSE

2.3.1	Standardisierung der Nick-Translation durch Optimierung der KpnI- und Bam HI-Fragmentlänge	44
2.3.2	Versuche zur Optimierung der <u>in situ</u> Hybridisierung	47
	Objektträgerbeschichtung	47
	Optimierung der Posthybridisierungsphase	48
2.3.3	Vergleich der akuten und chronischen Phase der CVB3- Infektion des Herzens in neun Inzuchtmäusestämmen unter Berücksichtigung des Einflusses von Infektionsalter und Geschlecht der Tiere	49
	<u>In situ</u> Hybridisierung	51
	Pathologisch-histologische Untersuchung	56
	Pathologische Anatomie	62
2.3.4	Rückisolierung infektiöser CVB3-Partikel aus dem Herzen infizierter Mäuse	63
2.3.5	Detektion von Serumantikörpern gegen die Polymerase und die Hüllproteine VP 1 und VP 4/2/3 von CVB3 im ELISA	66
2.3.6	Untersuchung weiterer Organe von CVB3 infizierten Mäusen mittels der <u>in situ</u> Hybridisierung	68

2.3.7	Gravidität CVB3 infizierter weiblicher Mäuse mit nachfolgender Untersuchung der Feten anhand der <u>in situ</u> Hybridisierung	68
2.3.8	Verträglichkeitsstudie für die subkutane, intramuskuläre und intraperitoneale Applikation unterschiedlicher Dosen von rekombinantem murinem Interferon-gamma	69
2.3.9	Antivirale Aktivität von rekombinantem murinem Interferon-gamma nach der Infektion von A.CA/Sn Mäusen mit CVB3	70
3	. DISKUSSION	74
4	. ZUSAMMENFASSUNG	80
5	. SUMMARY	81
6	. LITERATUR	82

1. EINLEITUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit ist zum einen die Etablierung eines Tiermodelles der CVB3 Infektion, das detaillierte und zuverlässige Verlaufsstudien dieses Krankheitsprozesses ermöglicht. Dazu werden neun verschiedene, ingezüchtete und congenetische Mäusestämme intraperitoneal infiziert und das Myokard hinsichtlich Auftreten und Erscheinungsbild der akuten Phase der CVB3 Infektion anhand der in situ Hybridisierung verglichen. Zur unterstützenden Diagnostik sollen darüberhinaus die histologische Untersuchung der Herzen, die Virusrückisolierung aus dem Herzwert sowie die serologische Detektion von Antikörpern gegen virale Polymerase und Hüllproteine herangezogen werden. Im Laufe dieser Arbeit soll ferner die Gelegenheit genutzt werden, die Technik der in situ Hybridisierung zu variieren und zu optimieren.

Zum anderen soll im Rahmen der weiterführenden Untersuchungen zur Erforschung dieses Krankheitskomplexes anhand jenes Mäusestammes, der das signifikanteste Ergebnis liefert, erstmalig ein postinfektioneller Therapieversuch mit subcutan verabreichtem, rekombinantem murinem Interferon (IFN) gamma durchgeführt werden. Die Beurteilung wird zunächst durch die histologische Untersuchung erfolgen, die in situ Hybridisierung wird aber auch hier als Nachweismethode sowohl der manifesten Myokarditis als auch der Wirkung des Interferons Anwendung finden. Für den Fall eines therapeutischen Effektes wird eine prozentuale Reduzierung der Signale in der autoradiographischen Darstellung zu erwarten sein.

1.1 Coxsackievirus B3 induzierte Myokarditis

Betrachtet man die Gesamtheit der in Frage kommenden Ursachen der Myokarditis hinsichtlich ihrer klinischen Bedeutung, so stehen hierbei die Virusinfektionen zweifelsohne an erster Stelle. Klinische und experimentelle Arbeiten legen nahe, daß zahlreiche Viren eine akute Myokarditis und möglicherweise auch chronisch verlaufende Herzerkrankungen auslösen können (Abelmann 1973, Schölmerich 1975, Woodruff 1980, Wynne und Braunwald 1980, Riecker 1982, Reyes und Lerner 1985). Im Hinblick auf die Häufigkeit der viralen Herzerkrankung ergibt sich eine deutliche Präferenz der Enteroviren gegenüber anderen RNA-Viren oder gar DNA-Viren, wenngleich auch für Vertreter aus dieser Gattung Zusammenhänge mit myokardialen Infekten beschrieben werden (Henson und Mufson 1971, Gardiner und Short 1973, Woodruff 1980). Die ubiquitär vorkommenden, zur Familie der Picornaviren gehörenden Enteroviren, vorrangig die Coxsackieviren der Gruppe B (Typ 1-5), sind, neben den Coxsackieviren der Gruppe A und den Echoviren, wohl am häufigsten mit den klinischen Symptomen einer Myokarditis assoziiert (Woodruff 1980). Der Nachweis einer viralen Beteiligung gestaltet sich bei einer Myokarditis in der Regel äußerst schwierig, da klassische Methoden wie etwa die pathologisch-anatomische Untersuchung durch Biopsierung erkrankter Patienten zwar möglich sind, aber keine ätiologische Diagnose gestatten. Serologische Antikörperbestimmungen erscheinen aufgrund der Vielzahl von potentiell kardiotropen Enteroviren nicht praktikabel. Beweisend für die klinische Verdachtsdiagnose einer Virusmyokarditis kann zudem nur der direkte Virusnachweis im erkrankten Herzgewebe sein (Kandolf 1988). Das Spektrum der hierbei zur Verfügung stehenden Techniken ist jedoch beschränkt. So erscheint beispielsweise die Virusrückisolierung nur in der akuten Phase der Erkrankung erfolgversprechend und setzt darüberhinaus eine exzessive Virusreplikation voraus. Der immunhistochemische Nachweis durch serotypische Antikörper ist, wie oben bereits erwähnt, aufgrund der Vielzahl von potentiell kardiotropen Enteroviren nicht praktikabel.

1.2 In situ Hybrisisierung in der Diagnose der viralen Myokarditis

Seit der Einführung der Myokardbiopsie durch Sakikabara und Konno 1962 besteht die Möglichkeit der direkten Myokarduntersuchung. Doch erst durch die rekombinante DNA-Technologie wurde mit der in situ Hybridisierung die Möglichkeit der Detektion viraler Genome auf zellulärer Ebene geschaffen. Sie ist im Bereich von Infektionskrankheiten anwendbar für die Detektion aller Viren, von denen eine charakterisierte, klonierte DNA-Sonde zur Verfügung steht (Kandolf 1988). So wurden mittels klonierter viraler DNA-Sonden durch molekulare Hybridisierung klinisch relevante Pathogene wie beispielsweise das Hepatitis B-Virus (Blum et al. 1983), oder das Humane-Immundefizienz-Virus (HIV) (Harper et al. 1986) und nicht zuletzt die Enteroviren (Kandolf et al. 1987a) in klinischen Proben nachgewiesen.

Das Prinzip dieses Verfahrens basiert auf der spezifischen Paarung komplementärer Nukleinsäuren. Die in situ Hybridisierung ermöglicht also den Nachweis eines infektiösen Agens auf der Ebene der genetischen Information, seine Zuordnung zur infizierten Zelle und damit auch die Identifizierung der Zielzellen. Dabei beträgt die Nachweisgrenze in Abhängigkeit von der Exponierungsdauer wenige virale Kopien pro Zelle und ist deshalb auch besonders zum Nachweis persistierender viraler Infektionen mit niedriger Repikationsfrequenz geeignet (Haase et al. 1984, Kandolf et al. 1986, Kandolf 1987a et al., Haywood 1986).

Entscheidende Vorteile birgt die in situ Hybridisierung weiterhin zum einen in der Erfassung von Virusmutanten im Sinne von "Prime strains", die mit typenspezifischen Antisera nur unzureichend oder überhaupt nicht erkannt werden (Melnick et al. 1979). Dies ist vor allem für Viren mit hoher Mutationsrate essentiell, die bei den kardiotropen Enteroviren mit 10^{-4} extrem hoch ist (Prabhakar et al. 1982). Zum anderen schafft sie die ein-



malige Möglichkeit, verschiedene Serotypen einer bestimmten Virusfamilie aufgrund ihrer genetischen Verwandtschaft gruppenspezifisch zu diagnostizieren. Gerade bei den über 70 Serotypen der Enteroviren stellt dies eine enorme Vereinfachung der Diagnostik dar.

So ist mit der *in situ* Hybridisierung ein bedeutsamer Schritt in Richtung auf eine hochsensitive Methode für die Diagnose der viralen Herzerkrankung gelungen. Weiterhin offen dagegen steht die Frage nach den Pathogenitätsmechanismen dieser Erkrankung und daraus resultierenden Therapiemöglichkeiten. Allgemein besteht in der klinischen Praxis jedoch die Schwierigkeit, daß ein großer Teil der Infektionen des Herzens subklinisch verläuft und gar nicht oder erst in einem späteren Stadium zur Vorstellung gelangt oder aber unentdeckt bleibt. Diese Variationsbreite der klinischen Manifestation machen systematische Untersuchungen zur Pathogenese dieses Krankheitsgeschehens äußerst schwierig. Dabei ist gerade die Virusmyokarditis eine Erkrankung, die aufgrund ihrer unerkannt hohen Inzidenz und Schwere eine Aufklärung dringend erforderlich macht. Für ein detailliertes Studium der Pathogenese der viralen Herzerkrankung ist in diesem Falle also die Etablierung eines Modellsystems im Versuchstier unumgänglich.

1.3 Versuchstiermodelle zur Cocksackievirus B3 induzierten Myokarditis

In der Vergangenheit wurden bereits Versuche zur Etablierung eines Modelles der CVB3 Infektion in der Maus unternommen. Dies ist von entscheidender Relevanz, da die durch CVB3 induzierte Myokarditis in speziell selektierten Mäuselinien epidemiologische und histologische Gemeinsamkeiten mit der humanen Myokarditis aufweist (Lerner and Wilson 1973, Matsumori and Kawai 1980, Reyes and Lerner 1985, Gauntt et al. 1987, Grun 1988).

Es stellte sich jedoch schnell heraus, daß die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten ebenso wie das Ausmaß einer Myokarditis von einer Reihe von Faktoren abhängig ist: Geschlecht, Infektionsalter, Genotyp der Tiere, Infektionsdosis und -weg sind ebenso wichtig wie die Organspezifität und die Virulenz des eingesetzten Virusisolates (Wilson & Lerner 1978, Woodruff 1980, Minnich & Ray 1980, Brinton et al. 1984, Wilson & Lerner 1985, Lyden et al. 1987a, Grun et al. 1988). Konkrete Aussagen über die genannten Faktoren sind bisher jedoch nicht möglich. So scheinen generell Zusammenhänge zwischen diesen Kriterien wie beispielsweise der Einfluß des Geschlechtes auf die Empfänglichkeit für eine CVB3 Infektion nur bei einzelnen bestimmten Mäuselinien regelmäßig aufzutreten. Wird dagegen eine andere Inzuchtlinie gewählt, lassen sich umgekehrte oder unkorrelierte Verhältnisse erkennen (Gauntt et al. 1984). Selbst innerhalb eines Mäusestammes lassen sich unterschiedliche Ergebnisse erzielen, falls Tiere aus verschiedenen Zuchtstätten verwendet werden. Wie Grun et al. 1988 am Beispiel der Balb/c Maus belegen konnten, weisen auch die Unterstämme eines Mäusestammes im Laufe von Generationen eine genetische Variabilität auf, die zu abweichenden Versuchsergebnissen führt (Hilgers et al. 1985).

Ebenso schwierig gestaltet sich die Charakterisierung der Empfänglichkeit in Abhängigkeit vom Infektionsalter der Mäuse. Das ursprüngliche Cocksackievirusisolat war vor allem für Mäuse unter zwei Wochen Lebensalter pathogen (Melnick et al. 1949, Dalldorf and Sickles 1948, Pappenheimer et al. 1950).

Nachfolgende Untersuchungen zeigten, daß CVB3 auch in juvenilen und adulten Mäusen eine Erkrankung auszulösen vermag (Woodruff 1980), wobei Lyden et al. (1987a) für Balb/c Mäuse im Alter bis zu 3 Wochen eine nur geringe Inzidenz, für 16 -18 Wochen alte Tiere dagegen die höchste Inzidenz der Myokarditis postulieren.

Nach parenteraler Infektion mit CVB3 kommt es im Wirtsorganismus zunächst zur Virämie, die innerhalb von 24 Stunden detektiert werden kann und in der Regel bis zum dritten Tag p.i. bestehen bleibt. Als Zielorgane der CVB3 Infektion, in denen eine exzessive Virusreplikation stattfindet, werden Herz, Leber, Milz, Pancreas sowie das Gehirn beschrieben (Woodruff 1980). Crowell et al. (1988) beobachteten eine chronologische Abfolge der Erkrankungen der genannten Organe während der akuten Infektion: Pancreatitis 3 Tage post inoculationem, Hepatitis 5 Tage p.i., Myokarditis 7-10 Tage p.i.

1.4 Das Interferonsystem

Interferone sind per definitionem Substanzen, die Zellen gegenüber Viren resistent machen (Stewart 1981). Es handelt sich dabei um Hemmstoffe mit Proteincharakter, die als Bestandteil der unspezifischen Abwehrmechanismen zu verstehen sind (Rolle et al. 1984). Sie werden, wie von Isaacs und Lindenmann erstmals 1957 nachgewiesen, von vertebraten Zellen nach Kontakt mit Induktoren produziert und an die Umgebung abgegeben. Ihre Wirkung ist dabei als virusunspezifisch aber zellspezifisch zu charakterisieren. Laut Interferon Committee (1983) unterscheidet man heute zwischen drei Gruppen von Interferonen (IFN).

1.4.1 Einteilung der Interferone

IFN-alpha:

Die IFN-alpha-Gruppe beinhaltet mindestens 20 Subtypen von strukturell verwandten, meist nicht glykosylierten Proteinen mit 165-166 Aminosäuren (Goeddel et al. 1981, Labdon et al. 1984). Die Kodierung von IFN-alpha erfolgt zusammen mit IFN-beta beim Menschen von Genen auf Chromosom 9 (Burke 1985). Es wird als Gemisch verschiedener Subtypen von Leukozyten nach Induktion durch virale Antigene produziert (Friedman und Vogel 1983), und zeichnet sich durch seine Säurestabilität aus (Rolle et al. 1984).

IFN-beta:

IFN-beta wird von Bindegewebszellen nach Virusinfektion oder Kontakt mit doppelsträngiger RNA produziert. Es handelt sich um ein säurestabiles Glykoprotein mit 166 Aminosäuren und hat auf Aminosäureebene eine Sequenzhomologie von 29% mit IFN-alpha (Taniguchi et al. 1980). Anders als bei IFN-alpha gibt es bei IFN-beta keine Subtypen; das sogenannte IFN-beta-2 ist lediglich mit IFN-beta verwandt und identisch mit dem " B-cell stimulatory factor " BSF-2 (May et al. 1986, Hirano et al. 1986).

IFN-gamma:

IFN-gamma wird von T-Lymphozyten nach Induktion mit Mitogenen gebildet und hebt sich durch seine immunmodulatorische Aktivität hervor. Es stellt ein Glycoprotein mit 143 Aminosäuren dar, besitzt im Gegensatz zu IFN-alpha und IFN-beta keine Disulfidbrücken, ist säurelabil und hat auch nur eine sehr geringe Sequenzhomologie mit den anderen IFN-Typen (DE Grado et al. 1982). Als weiteres wichtiges Unterscheidungskriterium ist zu erwähnen, daß IFN-gamma an einen eigenen Rezeptor bindet, während IFN-alpha und IFN-beta einen gemeinsamen Rezeptor benützen (Branca et Baglioni 1981, Rubinstein & Orchansky 1985, Celada 1988). Sein verantwortliches Gen ist beim Menschen auf Chromosom 9 lokalisiert (Burke 1985).

1.4.2 Wirkungen der Interferone

Interferone sind Substanzen, die eine Vielzahl unterschiedlichster biologischer Aktivitäten auslösen können. Aus medizinischer Sicht werden sie in die antiviralen-, die antiproliferativen- und die immunmodulatorischen Aktivitäten unterteilt, wobei diese Funktionen keineswegs isoliert voneinander betrachtet werden dürfen.

Antivirale Aktivität von Interferon

Per definitionem besitzen alle Interferone antivirale Wirkungen. In vivo und in vitro wird IFN (vor allem -alpha und -beta) von viral infizierten Zellen synthetisiert und ausgeschieden. IFN bindet dann an spezifische Membranrezeptoren noch nicht infizierter Zellen. Dadurch ändern sich in diesen Zellen eine Reihe von Zellaktivitäten und es kommt zur Synthese antiviral wirkender Proteine. Diese Proteine stellen Enzyme dar und führen zum Abbau viraler Nukleinsäuren, aber auch zur Hemmung der zellulären Proteinsynthese (Sen 1984, Burke 1985). Die antivirale Wirkung der Interferone besteht darin, nicht infizierte Zellen in einen antiviralen Status zu versetzen, in dem sie gegen die Infektion mit Viren geschützt sind. Dieser präventive Schutz besteht aus einem ganzen Spektrum verschiedener Aktivitäten. In einer großen Anzahl von Zellkulturexperimenten wurde gezeigt, daß Interferone auf nahezu jede Phase der Virusreplikation Einfluß nehmen können (Übersicht Sen 1982, Content 1984).

Die biochemischen Grundlagen dieser Vielzahl von antiviralen Mechanismen, die sich von einem Virus-Wirtszell-System zum anderen unterscheiden können, konnten bisher nur teilweise aufgeklärt werden. Bei den Picornaviren und damit auch den Coxsackieviren wird diese Wirkung hauptsächlich über eine Hemmung der Translation von Virusprotein aus viraler RNA erreicht (Munoz und Carrasco 1984). Bislang wurden drei verschiedene IFN induzierte Enzyme als Mediatoren der antiviralen Aktivität identifiziert. Am besten untersucht ist die 2'-5' Oligo-Adenylyl-Synthetase, ein En-

zym, das durch doppelsträngige RNA (dsRNA), die ausschließlich in virusinfizierten Zellen vorkommt, aktiviert wird und Adenosintriphosphat (ATP) zu einem atypischen Oligonukleotid, dem "2'-5A", polymerisiert. Diese Oligomere aktivieren eine Ribonuklease (RNase F), die ribosomale RNA und Polysomen degradiert und dadurch die virale Proteinsynthese hemmt (Johnston and Torrence 1984). Ein zweites IFN-abhängiges Enzym ist eine ebenfalls durch dsRNA aktivierte Proteinkinase, die den Initiationsfaktor für die ribosomale Proteinsynthese eIF-2 phosphoryliert. Hierdurch wird eIF-2 inaktiviert und somit die Rate der zelluläre Proteinsynthese vermindert (Clemens et al. 1982). Das dritte bekannte IFN-abhängige Enzym ist eine 2'- Phosphodiesterase, die allerdings erst durch hohe IFN-Konzentrationen induziert wird. Dieses Enzym wirkt im IFN-System als Inhibitor der antiviralen Wirkung, denn es degradiert die "2-5A", jedoch spaltet es auch aktivierte transfer-RNA und hemmt damit die Proteinsynthese (Sen 1982).

Der doppelsträngigen RNA (dsRNA) kommt eine besondere Rolle bei der Aktivierung des IFN-Systems zu, die Sen (1982) wie folgt beschreibt: Viren infizieren einige Zellen und induzieren möglicherweise über dsRNA als Signal die Synthese von IFN. Dieses neu synthetisierte IFN wird ausgeschieden, zirkuliert im Blut und bindet an Rezeptoren anderer Zellen. In diesen bisher uninfizierten Zellen werden dadurch die oben genannten dsRNA-abhängigen IFN-induzierten Enzyme synthetisiert (und andere IFN abhängige Proteine). Diese Enzyme sind aber nicht aktiv, weil in uninfizierten Zellen keine dsRNA vorliegt und beeinträchtigen deshalb auch den normalen zellulären Metabolismus nicht. Zellen, die mit IFN in Kontakt gekommen sind, befinden sich gewissermaßen in Verteidigungsposition: im sogenannten antiviralen Status. Werden solche IFN behandelten Zellen von einem Virus infiziert, tritt nun dsRNA im Zellinneren auf und aktiviert die bisher inaktiven Enzyme, was eine Hemmung der Proteinsynthese zur Folge hat. Diese Synthesehemmung vermag die Virusreplikation zum Stillstand zu bringen, kann aber auch bewirken, daß die infizierte Zelle abstirbt. (Sen 1982).

Antiproliferative Wirkung von Interferon

Früh entdeckte man, daß Interferone auch das Wachstum von Zellen hemmen (Pauker et al. 1962). Alle Phasen des Zellzyklus werden dabei verlängert, wobei angenommen wird, daß dieser Effekt unter anderem durch die 2'-5'Oligo-Adenylat-Synthetase vermittelt wird (Sen 1984).

Immunmodulierende Eigenschaften von Interferon

Interferone, besonders IFN-gamma, führen zu einer erhöhten Expression von Histokompatibilitätsantigenen (HLA) der Klasse I an der Zelloberfläche einer großen Anzahl von Zellen, wie in vitro als auch in vivo gezeigt werden konnte (Trinchieri and Perussia 1985, Schattner 1988). Hierdurch wird die Lyse von infizierten Zellen durch zytotoxische T Lymphozyten verstärkt (Wallach et al. 1982). Zusätzlich wurde in vitro und in vivo gezeigt, daß IFN-gamma auch zur Expression von Histokompatibilitätsantigenen der Klasse II auf Zellen führen kann, die nicht zum Immunsystem gehören (Groenewegen et al. 1985). Das von T-Lymphozyten produzierte IFN-gamma führt in der lokalen Umgebung zur Expression dieser HLA Antigene der Klasse II auf Epithelzellen, die somit auch als Antigen präsentierende Zellen fungieren können. Dadurch wird die immunologische Antwort auf fremdes Antigen verstärkt (Gresser 1984, Collins et al. 1984, Groenewegen et al. 1985). IFN-gamma ist darüber hinaus auch in der Lage, die T-Zell-abhängige Aktivierung von B-Lymphozyten zu stimulieren (Pischedda et al. 1987). Weiterhin tragen IFNe auch entscheidend zur Stimulierung des Komplementsystems, der Phagozytose, des lymphoretikulären Bindegewebes, von Prostaglandinen sowie von 'natural killer cells' bei (Rolle et al. 1984).

1.4.3 Einsatz der Interferone in vivo

Der erste Nachweis eines antiviralen Effektes von IFN *in vivo* gelang Lindenmann, Burke und Isaacs 1957, als sie Kaninchen im Anschluß an die Inokulation mit Vacciniavirus durch viertägige Interferonbehandlung vor der Infektion schützen konnten (Stewart 1981). Obwohl zwischenzeitlich zahlreiche Behandlungsversuche mit IFN an Versuchstieren erfolgreich verliefen (Ermolieva and Furer 1968, Neumann-Haefelin et al. 1977), müssen zur richtigen Beurteilung einer gezielten Anwendung von IFN in der antiviralen Therapie am Menschen vorab folgende Fragen Beachtung finden:

1. Welche Faktoren bestimmen die Empfänglichkeit eines Wirtes für ein bestimmtes Virus?
2. Wann kommt es zur Organmanifestation einer Virusinfektion?
3. Kann eine Virusinfektion nach dem Auftreten klinischer Symptome noch beeinflusst werden?

Die Bedeutung dieser Fragen wird deutlich, wenn man folgende Überlegungen ausführt. Einmal angenommen, IFN spielte nur im Frühstadium der Infektion (Eindringen und Vermehrung des Virus) eine entscheidende Rolle, wäre seine Applikation zwar ohne Zweifel von prophylaktischer Bedeutung, ein therapeutischer Einsatz bedürfte hingegen zuerst einer detaillierten Untersuchung im Tiermodell. Die Erfahrungen aus der klinischen Praxis hierzu lassen zum jetzigen Zeitpunkt noch keine klare Aussage zu, wenngleich schon erste Erfolge auf dem Gebiet der chronisch aktiven Hepatitis vorliegen (Caselmann et al. 1988).

Somit basiert also die gesamte Theorie einer antiviralen Therapie auf der Prämisse, daß sich der Ausgang einer Viruserkrankung noch nach dem Auftreten erster klinischer Symptome durch Hemmung der weiteren Virusreplikation beeinflussen läßt.

2. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

2.1 MATERIAL

Chemikalien

Äthanol, absolut	Riedel de Haen
ABTS	Sigma
Aceton	Riedel de Haen
Agarose	Seakem
Ammoniumacetat	Merck
Aquasol-2	NEN Research Products
Bromphenolblau	Serva
Calciumchlorid	Merck
Dextransulfat	Pharmacia
Diäthylpyrocarbonat	Sigma
Dithiothreitol	Pharmacia
Entwickler D 19	Kodak
Essigsäure	Riedel de Haen
Ethidiumbromid	Sigma
Ficoll	Pharmacia
Fixierbad	Ilford Hypam
Fixogum	Marabuwerte
Formamid	Merck
Fotoemulsion	Kodak
Type NTB 2	
Kristallviolett	Sigma
Magnesiumchlorid	Merck
2- β -Mercaptoäthanol	Roth
Natriumchlorid	Merck
Natriumlaurylsulfat	Merck
Polyvinylpyrrolidon	Serva
Sephadex G 50	Pharmacia
Silikonlösung	Serva

Tetramethyläthylendiamin
Trichloressigsäure
Tri-Natriumacetat-Dihydrat
Tween 20
Wasserstoffperoxid

Serva
Riedel de Haen
Merck
Sigma
Merck

Interferon

rekombinantes, murines Interferon
gamma

Biogen Research Corp.
Ernst Boehringer Institut
f. Arzneimittelforschung

Nukleinsäuren und Nukleotide

Desoxynukleotide, unmarkiert
Desoxynukleotide, ³⁵S markiert
Transfer-RNA
Salmon sperm DNA

Pharmacia
Amersham
Sigma
Pharmacia

Proteine und Enzyme

CVB3 Expressionsproteine
(VP 1, VP 4/2/3, Polymerase)
Hybridomaüberstände
Polyklonale Antiseren (CVB3)
POD-konjugiertes Anti-Maus Immun-
globulin
Proteinase K
Restriktionsenzym KpnI
" Bam HI
DNase I
E.coli-Polymerase
Trypsin
Bovines Serumalbumin

Diplomarbeit H.Schönke,
MPI für Biochemie
"
"
Dakopatts
Merck
Pharmacia
Pharmacia
Pharmacia
Pharmacia
Seromed
Boehringer

Versuchstiere

Inzuchtmäusestämme:	NUNU/NMRI	Zentralinstitut für
	SJL/J	Versuchstierzucht
	DBA/2J	Zentralinstitut für
		Versuchstierzucht
	DBA/1J	Max-Planck-Institut für
		Biologie, Tübingen
	SWR/J	Jackson Laboratories
	ACA/Sn	Jackson Laboratories
	ASW/SnJ	Jackson Laboratories
	PL/J	Jackson Laboratories
	ABY/SnJ	Jackson Laboratories

Virusstock

Coxsackievirus B3, Nancy strain	American Type Culture Collection
---------------------------------	-------------------------------------

Zelllinie

Verozellen	American Type Culture Collection
------------	-------------------------------------

Zellkulturmedium

Dulbecco's Minimal Eagle Medium	Gibco
Foetales Kälberserum	Gibco
Mediumzusätze: Hepes	Seromed
Kanamycin	Seromed

Weitere Materialien

Deckgläschen	Assistent
Färbeschalen	Assistent
Färbeeinsätze	Assistent

295 PE-polyäthylen- beschichtetes Filterpapier	Schleicher & Schuell
3 MM Filterpapier	Whatman
DE 81 Filterpapier	Whatman
Objektträger	Assistent
Objektträgerständer	Assistent
Objektträgerkästen	Dr.Bender und Hobein
Bechergläser, verschiedene Größen	Schott
Meßzylinder, verschiedene Größen	Schott

Puffer und Lösungen

Denhardt's Lösung (100x):	Bovines Serum Albumin	2%
	Polyvinylpyrrolidon	2%
	Ficoll	2%
	H ₂ O bidest	ad 100 ml
PBS- (phosphate buffered saline, calcium- und magnesiumfrei) pH 7,2	NaCl	1,37 M
	KCl	0,003 M
	Na ₂ HPO ₄	0,006 M
	KH ₂ PO ₄	0,001 M

Puffer für die Gelelektrophorese:

TBE	Tris	0,089 M
	H ₃ BO ₃ (Borsäure)	0,089 M
	EDTA pH 8,0	0,003 M

6.6.2.- Puffer:	Tris pH 7,2	6 mM
	NaCl	6 mM
	EDTA pH 7,2	0,2 mM

Stammlösungen für die in situ Hybridisierung:

Tris pH 7,4	1 M
EDTA pH 7,4	0,2 M
NaCl	4,2 M
SSC (20x)	NaCl 3 M + $C_6H_5Na_3O_7 \cdot H_2O$ 0,3M
CH_3COONH_4	3 M
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,2 M

Weitere Puffer finden bei den entsprechenden Methoden Berücksichtigung.

2.2 METHODEN

2.2.1 Isolierung des rekombinanten Plasmides pCB3 M1

Plasmidpuffer 1	25 mM Tris/HCl, pH 8 10 mM EDTA 50 mM Glucose
Plasmidpuffer 2	200 mM NaOH 1 % SDS
Plasmidpuffer 3	150 mM Tris/HCl, pH 8,75 0,8 % Sarkosyl 8 mM EDTA

Der gewünschte Klon von E.coli wurde über Nacht in einer 500 ml Kultur bei 37°C und unter Zusatz von Ampicillin bis zur stationären Phase hochgezogen. Nach Zentrifugation im GS3-Rotor (3000 rpm, 30 Minuten bei 4°C) konnten die Zellen geerntet und das Zellpellet in 40 ml Plasmid-Puffer 1 suspendiert werden. Der Zellwandverdau erfolgte durch 30 minütige Inkubation mit 2 ml frisch angesetzter Lysozymlösung auf Eis. Daraufhin wurden die Zellen mit 75 ml Plasmid-Puffer 2 lysiert und anschließend 5 Minuten lang auf Eis belassen. Durch Zugabe von 50 ml eiskaltem 3 M NaOAc und nach 60 minütiger Ruhephase auf Eis wurde der Großteil der Proteine ausgefällt und im GS3 Rotor pelletiert (9000 rpm, 30 Minuten, 2°C). Der Überstand wurde durch Verbandmull dekantiert, mit 325 ml technischem Ethanol versetzt und für 2 Stunden bei -70°C belassen. Anschließend konnten die enthaltene RNA und DNA pelletiert (GS3-

Rotor, 9000 rpm, 30 Minuten, 2°C), der Überstand verworfen und das Pellet in 9 ml Plasmid-Puffer 3 aufgenommen werden. Dieser Lösung wurden 2 ml Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml) und 9 g CsCl zugesetzt und in Polyallomer "Quick-Seal-Röhrchen" transferiert, in denen die Zentrifugation im Vertikalrotor bei 18°C und 4500 rpm erfolgte. Nach der Zentrifugation waren die Nukleinsäurebanden ohne UV-Licht sichtbar. Mit Hilfe einer Kanüle gelang die seitliche Entnahme vorab der oberen Bande an chromosomaler DNA sowie der unteren Bande an Plasmid-DNA (ca 2ml). Die Plasmid-DNA wurde in kleine Polyallomer "Quick-Seal"- Röhrchen überführt, die Röhrchen mit CsCl-Lösung aufgefüllt und die DNA durch Zentrifugation im TI 50-Rotor bei 45000 rpm über Nacht rebandiert. Die Plasmidbande wurde erneut gezapft, mit dem gleichen Volumen an 6.6.2.-Puffer gemischt und die DNA mit Ethanol gefällt. Nach Pelletierung wurde diese in 1 ml 6.6.2.-Puffer aufgenommen und mit dem gleichen Volumen Tris/HCl gesättigten Phenol/Chloroform-Gemisch zweimal extrahiert. Darauf folgte eine zweimalige Extraktion mit Chloroform /Isoamylalkohol (24:1), gefolgt von einer zweimaligen Präzipitation in 70%-igem Ethanol. Das finale Pellet wurde in 6.6.2.-Puffer aufgenommen.

2.2.2 Isolierung der Fragmente Kpn I und Bam H I

Waschpuffer

10mM Tris/HCl, pH 7,5
1 mM EDTA
100 mM LiCl

Elutionspuffer

1 M LiCl
10 mM Tris/HCl, pH 7,5
1 mM EDTA
20% Ethanol

Die Fragmentisolierung umfasst im wesentlichen die beiden folgende Abschnitte:

- Restriktionsenzymverdau
- Präparation einschließlich Elektroelution, Phenolisierung und Alkoholfällung

a. Restriktionsenzymverdau

Ansatz für den Restriktionsenzymverdau:

	KpnI	Bam HI
DNA	100 µg	200 µg
Enzym	60 U/µl	12 U/µl
Puffer	1/10 Vol	1/10 Vol
H ₂ O	ad Vol	ad Vol
	400 µl	800 µl

Der Ansatz für den Verdau wurde über Nacht im Wasserbad bei 37°C inkubiert und am darauffolgenden Tag die Vollständigkeit des Verdaus mittels Gelelektrophorese (1%-iges Mini-Agarosegel, Auftrag von 1 µl Verdau) überprüft.

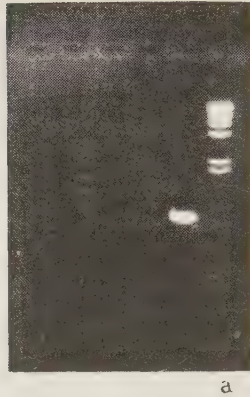


Abb. 1: Verdau von pCB3 M1 mit dem Restriktionsenzym Bam HI
a = Lambda-DNA, Hind III geschnitten

b. Präparation

Die Auftrennung der beim Restriktionsverdau entstandenen Fragmente erfolgte auf einem 1%igen präparativen Agarosegel. Dabei ist eine Überladung der Slots zu vermeiden, da sonst mit einer Verringerung der Ausbeute zu rechnen ist. Erfahrungsgemäß wurden hierbei für das KpnI-Fragment je 50 µg eingesetzte cDNA und für das BAM H I Fragment je 100 µl eingesetzte cDNA auf 7 vereinte Slots aufgetragen. Bei einer Spannung von etwa 50-60 Volt und 35 mA wurde das Gel zunächst trocken geladen (Zugabe von 1/10 Vol Bromphenolblau in final 400 µl/7 Slots, eventuelle Volumenergänzung mit 6.6.2.), um nach Austritt der Probe aus dem Slot mit 1 x TBE-Puffer überflutet zu werden. Nach circa 17-20 Stunden konnte die Wanderung der einzelnen Fragmente unter UV-Licht kontrolliert werden. Bei ausreichender Auftrennung erfolgte nun das Ausschneiden der 6,2 kb-Bande ebenfalls unter UV-Licht.

Elektroelution

Die ausgeschnittene cDNA Bande wurde auf ein rechtwinklig gefaltetes Elutionsfilterpapier (Whatman DE 81) (siehe nachfolgende Skizze) gebracht und zwischen die beiden Hälften eines zweiten Agarosegels gepreßt, wobei das Filterpapier zum positiven Pol wies. Bei einer Spannung von 100-110 Volt wanderte die DNA innerhalb von 1,5 bis 2 Stunden aus dem Gelstreifen in den senkrecht stehenden Filterpapieranteil. Als leitendes Medium zwischen Puffer und Gel dienten mehrere Lagen angefeuchtetes Whatman-Filterpapier, da die Gelkammer nicht überflutet werden durfte.



Skizze 1: Seitenansicht von Agarosegel und Filterpapier, schematisiert.

Nach Beendigung der Elution (Kontrolle unter UV-Licht!) konnte die DNA-Sonde aus dem Filterpapier eluiert werden. Dazu wurde der unter UV-Licht leuchtende Anteil des Filterpapiers ausgeschnitten, zu einer Spirale aufgerollt und in ein 0,5 ml-Eppendorf Gefäß überführt, das sich seinerseits mit eröffneter Spitze in einem 1,5 ml-Eppendorf Gefäß befand. Es folgten 4 Waschvorgänge (auf Eis) mit je 200 µl Waschlösung und anschließendem Abzentrifugieren, wobei die Probe im letzten Waschschritt für 30 Minuten auf Eis verblieb.

Zur Elution der DNA-Sonde aus dem Filterpapier wurde der Elutionspuffer in einem Volumen von 200 μ l/Probe zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um ihn anschließend mit der eluierten DNA kurz abzuzentrifugieren. Nach dreimaliger Wiederholung des Vorganges wurde das Volumen des gesammelten Eluates in einer Alkoholfällung (1,5-faches Volumen absoluten Alkohols und 10 Vol.% 8 M Lithiumchlorid für eine Stunde bei -80°C) verringert. Abschließend wurde das Pellet nach einem Zentrifugationsschritt für 30 Minuten bei -20°C und 11000 rpm in etwa 150 μ l 6.6.2.-Puffer aufgenommen.

Phenolisierung

Zur Phenolisierung wurde der in 6.6.2.-Puffer gelösten DNA ein Volumen an wassergesättigtem Phenol zugeführt und eine Minute lang kräftig gemischt. Nach Zentrifugation (11000 rpm, 10 Minuten) konnte die DNA-haltige, wässrige, oben befindliche Phase mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen werden. Nach Wiederholung des Vorganges wurde die Probe in analoger Weise zweimal mit einem Isoamylalkohol/Chloroformgemisch (24:1; Vol/Vol) ausgeschüttelt. Am Ende der Fragmentisolierung erfolgte eine zweite Alkoholfällung mit nachfolgender Aufnahme des Pellets in ca. 50-100 μ l 6.6.2.-Puffer. Zum Abschluß wurde die OD (optische Dichte) bei 260 nm bestimmt.

2.2.3 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten durch Nick-Translation

Diese Methode diente im späteren Schritt der in situ Hybridisierung dem Nachweis von viraler RNA auf zellulärer Basis. ^{35}S -markierte Fragmente des klonierten Coxsackievirusgenomes hybridisieren hierbei mit der viralen RNA in infizierten Zellen. Zur Erzeugung dieser ^{35}S -markierten cDNA-Fragmente erfolgte ein "Aufknacken" des cDNA-Stranges an mehreren Stellen durch die DNase I. Dadurch entstehen Einzelstrangbrüche, sogenannte "nicks", die den Angriffspunkt für die Exonukleaseaktivität der Polymerase darstellen. Ausgehend vom 3'-Ende der Bruchstellen wurde der DNA-Strang verdaut und gleichzeitig die Lücken vom 5'-Ende her unter Einbau der angebotenen ^{35}S markierten dCTP und dATP-Nukleotide wieder geschlossen.

Teil 1

Für die KpnI- und BAM HI-Fragmente wurden zwei getrennte Ansätze folgendermaßen vorbereitet:

- Je 10 μl ^{35}S -dCTP und ^{35}S -dATP zusammen 15 Minuten lang eindampfen (Speed Vac Concentrator)
- Zugabe von 1 μl einer 2 mM dGTP- und dTTP - Stocklösung
- Zugabe von 0,5 μl cDNA (entsprechend Kpn I oder Bam HI-Fragment)
- Zugabe von 1 μl DNase I-Verdünnung
(Kpn I-Fragment: 1 : 175)
(Bam H I-Fragment: 1 : 200)
- Zugabe von x μl H_2O (ad Endvolumen)
- 1 Minute lang vortexen
- Zugabe von 2 μl E. coli Polymerase I
- vorsichtig mischen, kurz abzentrifugieren,
- Endvolumen: 20 μl
- Inkubation im Wasserbad bei 15° C für 2,5 Stunden
- Stop der Reaktion durch Zugabe von 1 μl 0,125 M EDTA und
- 1 μl 5%-iges SDS

Teil 2

Abtrennung der freien Nukleotide durch Molekularsiebchromatographie:

- Herstellung einer Sephadex G 50-Säule (aus einer 1ml Tuberkulinspritze ohne Stempel).
- Füllen der Säule mit Sephadex G 50 bis zur Marke 1 ml, abzentrifugieren für 5 min bei 2000 rpm und Korrektur des Volumens, bei Abweichung nochmals wiederholen.
- Auftragen der Nick-Translationsprobe auf die Säule und 5 minütiges Zentrifugieren bei 2000 rpm, Eluat in einem 1,5 ml- Eppendorf-Gefäß auffangen.
- Szintillationsmessung: 2 µl Probe gut in 10ml "Aquasol 2"- Szintillationsflüssigkeit lösen und messen.
- Errechnen der spezifischen Aktivität (cpm/µl Eluat und cpm/µl DNA).

Auf diese Weise erzeugte Sonden wiesen eine spezifische Aktivität $> 2 \cdot 10^8$ cpm/µg DNA auf.

Die Länge der cDNA-Fragmente wurde anhand der Gelelektrophorese auf einem 6%igen Polyacrylamidgel sowie einem 2%igen Agarosegel kontrolliert.

2.2.4 Methode der in situ Hybridisierung

Vorbereitungen zur in situ Hybridisierung

Für alle Arbeitsschritte im Rahmen der in situ Hybridisierung dürfen ausschließlich sterile und RNase-freie Chemikalien sowie gebackene Glaswaren (Erhitzung auf 220° C für 8 Stunden) verwendet werden. Pinzetten müssen vor Gebrauch ausreichend ausgeglüht werden.

a) Objektträger

Objektträgerständer (für 42 Objektträger) in einem 3 l Becherglas backen, mit neuen Objektträgern (OT) füllen und zur Reinigung mindestens über Nacht in Aceton/Äthanol (1:1) kühl lagern. Im weiteren Vorgehen wurden die Objektträger nach Trocknung (1 Stunde bei 100°C) einem vierstündigen Tauchbad unterzogen in:

- 3 x SSC
- 1 x Denhardt's Lösung
- ad 1500 ml mit H₂O bidest, autoklaviert

Darauf folgte ein einmaliges Tauchen in dd H₂O, anschließend eine 20 minütige Fixierung in Äthanol/Essigsäure = 3:1 und nach nochmaligem Tauchen in absolutem Äthanol die Trocknung bei 65°C.

b) Deckgläschen

Steril verpackte Deckgläschen wurden für 30 min in 2%-iger Essigsäure gereinigt, zweimal in dd H₂O, einmal in absolutem Äthanol gespült und anschließend auf 3 MM Whatman Filterpapier einzeln zum Trocknen ausgelegt. Zur Silikonisierung, die verhindern soll, daß mit dem Ablösen der Deckgläschen nach erfolgter Hybridisierung auch die Schnitte abge-

hoben werden könnten, wurden die Deckgläschen einzeln in Silikon getaucht. Nach Trocknung, wiederum bei 100°C, war die Lagerung üblicherweise bei Raumtemperatur.

c) Anfertigung der Gefrierschnitte

Die tiefgefrorenen Organproben (-80°C) wurden mittels physiologischer Kochsalzlösung auf den Stempel des Kryotomes aufgefroren und anschließend bei einer Temperatur von -20°C geschnitten. Der Anschneidewinkel betrug dabei 5 Grad, die Schnittdicke 10 µm. Die fertiggestellten Schnitte wurden sofort auf die vorgekühlten, vorbehandelten Objektträger gebracht. Etwa 4-8 Schnitte bedeckten so die beiden Hälften eines Objektträgers und wurden direkt im Anschluß daran bei 40-45°C getrocknet. Da dieser Trocknungsschritt wesentlich zur Haftung der Schnitte auf den Objektträgern beiträgt, sollte er sich über mindestens 1,5 Stunden, besser jedoch 2-3 Stunden, erstrecken. Die getrockneten Schnitte wurden in einem Äthanol/Essigsäure Gemisch (3:1) 20 Minuten fixiert und in absolutem Äthanol, luftdicht verpackt, bei -80°C bis zur Hybridisierung aufbewahrt.

d) Vorbereitung der Gefrierschnitte für die Hybridisierung

Die Schnitte wurden hierbei der Beeinflussung mehrerer Agenzien unterzogen, um einerseits Proteine zu denaturieren und proteolytisch zu spalten, während andererseits der Eintritt der radioaktiven Sonde ins Gewebe ermöglicht werden soll. Dabei wurden die Schnitte (zu jeweils 10 OT) der nachfolgenden Behandlung unterzogen:

- 5" H₂O
- 20' 0,2 M HCL
- 5" H₂O
- 30' 2 x SSC
- 5" H₂O
- 15' 20 mM Tris, pH 7,4, 2 mM CaCl₂, 1 µg/ml Proteinase K
- 5" H₂O
- 10" H₂O
- 2' Äthanol 70%-ig
- 2' Äthanol 70%-ig
- 5' Äthanol 90%-ig

Die Schnitte wurden anschließend bei 40°C für mindestens 1,5 Stunden getrocknet.

Hybridisierung der Proben

a) Herstellung des Hybridisierungsansatzes

Der Hybridisierungsansatz setzt sich aus den nachfolgenden Komponenten zusammen und wurde in einem Volumen von 14 µl je Deckgläschen (d.h. 2 x 14 µl je Objektträger) auf die Schnitte aufgetragen. Auf Eis wurden zunächst

- 1 x 10⁵ cpm/slide (spez. Aktivität > 1·10⁸ cpm/µg DNA-Sonde)
- 50 % Formamid
- 10 mM Tris pH 7,4
- 1 mM EDTA pH 7,2
- 200 µg/ml calf thymus DNA oder
200 µg/ml salmon sperm DNA
(sonifiziert, mittlere Fragmentlänge unter 500 bp)
- 100 µg/ml t-RNA (rabbit liver)

gut gemischt und 5 Minuten lang bei 100°C gekocht, wodurch Einzelstränge in der radioaktiv markierten DNA erzeugt werden. Die beiden markierten Fragmente, Kpn I und Bam HI, wurden zusammen in einem Hybridisierungsansatz im molaren Verhältnis 1 : 1 eingesetzt. Sowohl zur Vermeidung unspezifischer Bindungen als auch zur Stabilisierung der DNA-Sonde wurden

- 600 mM NaCl; 10% Dextransulfat
- 10 mM Dithiothreitol
- 0,1% BSA
- 0,1% Ficoll
- 0,1% Polyvinylpyrrolidon
- 0,1% SDS

hinzugegeben und erneut gut gemischt. Nach dreißigminütiger Vorhybridisierung bei 37°C wurde der Ansatz 5 Minuten lang bei 11000 rpm zentrifugiert, um eventuell ungelöste Partikel absetzen zu lassen. In oben genanntem Volumen wurde die Hybridisierungslösung schließlich auf die Schnitte aufgetragen und mit den silikonisierten Deckgläschen abgedeckt. Mit dem Montageklebstoff "Fixogum" wurden die Hybridisierungsproben vor der Austrocknung geschützt.

b) Hybridisierung

Die Hybridisierung erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 30°C und absoluter Dunkelheit für die Dauer von 48 Stunden.

c) Waschen der hybridisierten Proben

Zur Beendigung der Hybridisierung wurden die Deckgläschen vorsichtig abgelöst und die Proben mehreren Waschschritten unterzogen.

Zusammensetzung des Waschpuffers: - 50% Formamid

- 10 mM Tris pH 7,4
- 1 mM EDTA pH 7,2
- 600 mM NaCl

Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

- 4-maliges Tauchen jedes Objektträgers in je 200 ml Waschpuffer (20 Objektträger/Becherglas)
- 5' 2 x SSC
- 5' 2 x SSC
- über Nacht in 30°C warmem Waschpuffer
- 24 h in 25 - 28°C warmem Waschpuffer
- 60' 2 x SSC
- 5' 2 x SSC
- 5' 2 x SSC
- 3' 70% Äthanol + 300 mM Ammoniumacetat
- 3' 90% Äthanol + 300 mM Ammoniumacetat
- Trocknung bei 40°C

Autoradiographie der Hybridisierungsproben

1. Vorbereitung der Photoemulsion

Nach ihrer Verflüssigung im Wasserbad bei 50°C wird die Photoemulsion im Verhältnis 3:1 mit Ammoniumacetat (final 300 mM) gemischt und mehrere Portionen angelegt, die vor Gebrauch durch doppelte Gaze zur Entfernung von Luftblasen filtriert wurden.

2. Befilmen der Objektträger

Die Objektträger wurden einzeln ca. 2 Sekunden lang in die Emulsion getaucht und anschließend in einen Objektträgerkasten sortiert. Zur Aufnahme der Feuchtigkeit bewährte sich die Einlage von Silicagel. Vor Abschluß der Arbeit in der Dunkelkammer mußte der nunmehr gefüllte Objektträgerkasten in mindestens zwei Lagen dicke Alufolie sowie eine Plastikfolie verpackt werden, um eine absolut dunkle und trockene Lagerung zu gewährleisten. Die Exposition erfolgte zunächst über Nacht bei Raumtemperatur, später bei 4°C.

3. Entwicklung der exponierten Proben

Zur Entwicklung wurden die Objektträger in OT-Ständer umsortiert und wie folgt behandelt.

- 5' H₂O
- 10' Entwickler (16-20°C)
- Tauchen in H₂O
- 15' Fixierbad
- 20' H₂O

Die entwickelten, trockenen Gewebeschnitte waren nunmehr der Untersuchung in einem Interferenzkontrastmikroskop zugänglich.

2.2.5 Zellkultivierung

Die verwendeten Zellkulturen wurden während der gesamten Versuchsdauer bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Es erfolgte ein zweimaliger Mediumwechsel sowie durchschnittlich eine Passage wöchentlich. Hierzu wurde das Medium abgenommen, der Zellrasen mit PBS- gewaschen und die Zellen nach Zugabe von 0,5 ml (Angabe für ein 25 cm² Kulturgefäß) einer 0,25%-igen Trypsinlösung ca. 20 Minuten lang im Brutschrank inkubiert. Die vom Boden abgelösten Zellen wurden in Medium mit 10% FKS aufgenommen, vorsichtig suspendiert und in neue Kulturflaschen mit der entsprechenden Menge an Medium eingesät.

Der Mediumüberstand richtete sich nach der Zellkulturoberfläche: beispielsweise 5 ml Medium bei 25 cm² Kulturfläche. Hiervon ausgehend lassen sich die Mediumvolumina anderer Kulturgefäße berechnen.

2.2.6 Rückisolierung von CVB3 aus dem Herzen infizierter Mäuse in konfluenten Verozellmonolayern

Zum Nachweis infektiöser CVB3 Partikel im Herzgewebe wurde etwa ein Drittel des Herzens nach der Tötung der Mäuse mit "T61" steril entnommen, homogenisiert und 50 µl des Überstandes auf nahezu konfluente Verozellkulturen (Durchmesser 60 mm) übertragen. Diese Kulturen wurden täglich für die Dauer von 21 Tagen beobachtet. Bei vollständiger Lyse des Zellrasens wurde die betreffende Probe als positiv beurteilt, was in der Regel nach zwei- bis dreitägiger Inkubation der Fall war. In Abständen von 10 Tagen wurde, solange sich noch keine Zelllyse eingestellt hatte, jeweils 1 ml der Mediumüberstände auf neue Monolayer passagiert. Alle Zellkulturen wurden zumindest über drei Wochen beobachtet.

2.2.7 Erzeugung eines kardiotropen Virusstocks der "large plaque" Variante von CVB3

Experimentell erzeugte Myokarditiden durch Picornaviren zeichnen sich häufig durch das Vorkommen von Varianten verschiedener Plaquegrößen aus, die sich offensichtlich in ihrer Pathogenität unterscheiden und auf eine hohe Mutationsrate zurückzuführen sind (Prabhakar et al. 1982, Hartig and Webb 1986). Das Verfahren der Plaquereinigung zielt ab auf die Erzeugung eines Virusstocks, dessen infektiöse Partikel alle die gleiche, maximale Virulenz dieses Stammes besitzen. Für die Fähigkeit dieser Viren, eine Myokarditis in der Maus zu erzeugen, spielt zudem auch der Grad ihrer Adaptation an das Herzgewebe eine große Rolle (Hartig et al. 1986). Aus diesem Grund wurde neben der Plaque-Reinigung auch eine mehrfache Passagierung des CVB3-Stockes in Mäuseherzen durchgeführt.

Passage von CVB3 in Mäuseherzen

Es wurde das Herz einer mit CVB3 infizierten Maus (5×10^4 PFU) 7 Tage nach Infektion steril entnommen und in 250 μ l PBS- homogenisiert und 10 Minuten bei 2000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf einen konfluenten Verozellmonolayer gegeben. An die Gewinnung des Zellkulturüberstandes, dessen Titer im Plaque-Test ermittelt wurde, schloß sich die Infektion einer zweiten Maus an, an der sich das beschriebene Vorgehen wiederholte. Die Charakterisierung dieses passagierten Virusstocks geschah durch die nachfolgende Plaque-Reinigung sowie durch den Plaque-Test.

Plaque-Reinigung von CVB3

Das Vorgehen stimmt mit dem des Plaque-Tests (siehe Kapitel 2.2.7) bis zur Überschichtung der infizierten Monolayer mit Agar überein. In Abweichung von diesem werden die Zellen im Bereich des größten Plaques (Kennzeichnung unter Vergrößerung am Boden der Kulturschale) nach 48-stündiger Inkubation mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette abgenommen und auf eine konfluente Zellkultur überführt. Sobald etwa 80% der Zellen lysiert waren (je nach Größe der Kulturfläche nach 1-3 Tagen), wurde der Zellüberstand geerntet, dreimal hintereinander eingefroren und wieder aufgetaut, um die noch intakten Zellen zu sprengen und die enthaltenen Viruspartikel freizusetzen. Zum Abschluß wurde der Zellüberstand 10 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert und portionsweise bei -80°C , besser noch in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

Plaque-Test zum quantitativen Virusnachweis

Das Prinzip des Plaque-Testes besteht im Nachweis von Lysezonen in Zellkulturen, die von nur einem infektiösen Viruspartikel hervorgerufen wurden, um so eine Aussage über den Gehalt des Virusstocks an "Plaque-forming-units" (kleinste infektiöse Einheit) treffen zu können. Zur Erzeugung konfluenter Monolayer (Durchmesser 60 mm) wurden 7×10^5 Verozellen pro Petrischale ausgesät und am nächsten Tag folgendermaßen infiziert: nach Absaugen des Mediums und Waschen des Zellrasens wurden die Schalen mit je 0,5 ml einer seriellen Virusverdünnung versetzt, 1 Stunde bei 37° Grad inkubiert und anschließend mit 4 ml 1%iger Agarose in 2x DMEM (ergänzt mit 7,5% FKS, 15 mM MgCl_2 , 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Kanamycin) überschichtet. Darauf folgte eine 48-stündige Inkubationsphase. In diesem Zeitraum findet die Virusvermehrung statt, wobei jedes einzelne infektiöse Viruspartikel für die Entstehung einer Lysezone verantwortlich ist. Die Bereiche lysierter Zellen wurden nach der Fixierung mit 5%iger Trichloressigsäure und Färbung mit 0,3%iger Kristallviolettflö-

sung als ungefärbte "plaques" sichtbar und konnten für die einzelnen Verdünnungsstufen ausgezählt werden. Entsprechend der eingesetzten Virusdosis wurde der Virustiter bestimmt. Beispiel: 20 Plaques bei einer Verdünnung von 10^{-5} ergeben einen Titer von 4×10^6 PFU. Als Positivkontrolle wurden Virusstocklösungen bekannten Titers verwendet, Negativkontrollen wurden mit PBS- inkubiert.

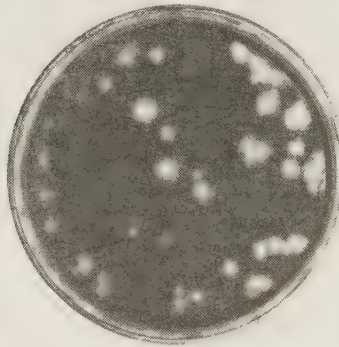


Abb.2 : Plaque-Test in der Verdünnungsstufe 10^{-6} . Der Virusstock mit dem hier ermittelten Titer von 8×10^7 PFU/ml wurde für alle Infektionsversuche im Verlauf dieser Arbeit verwendet.

2.2.8 Infektion von Versuchstieren mit CVB3

Die Virusinokulation erfolgte bei allen Mäusestämmen während der gesamten Versuchsdauer auf intraperitonealem Wege. Dazu wurde das berechnete Volumen an Virusstocklösung in 200 µl PBS- aufgenommen und im Bereich lateral des 10. Mammarkomplexes in cranialer Richtung und parallel zur ventralen Bauchwand injiziert, wobei die Tiere durch manuelle Fixierung des Schultergürtels immobilisiert wurden.

2.2.9 Gewinnung von Organproben aus infizierten Mäusen

Zur exzitationslosen Tötung der Tiere wurde "T 61" (0,2g Embutramid, 0,05g Mebezoniumjodid, 0,005g Tetracainhydrochlorid) (0,35 ml/10g, i.p.) eingesetzt. Nach Fixierung in Rückenlage wurden Haut und Körperhöhlen getrennt eröffnet, um eine Kontamination zu vermeiden. Anschließend erfolgte die sofortige sterile Entnahme des Herzens mit Abtrennung des basisseitigen Herzdrittels für die spätere Virusrückisolierung. Der zurückgebliebene Herzanteil wurde, ebenso wie andere entnommene Organe, in flüssigem Stickstoff oder Freon 22 schockgefroren und bei -80°C Grad aufbewahrt.

2.2.10 ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) zum Nachweis der murinen Antikörperproduktion gegen die Hüllproteine VP 1, VP 4/2/3 und Polymerase von CVB3

Beschichtungspuffer	0,05 M Tris/HCl pH 9,3
Absättigungslösung	3% BSA in PBS
Waschpuffer	1,55 M NaCl 1% Tween 20 Aqua bidest.
Phosphat-Citrat-Puffer (PC-Puffer)	0,03 M Citronensäure 0,07 M Na_2HPO_4 Aqua bidest.
ABTS-Lösung	1 mg/ml 2,2'-Azinobis (3-Ethylbenz-Thiazolin Sulfonsäure) 0,03% H_2O_2 PC-Puffer

Im ELISA können Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen nachgewiesen und gemessen werden. Das Prinzip beruht auf der unspezifischen Bindung von Proteinen (Antigenen) an ein festes Trägermaterial aus Kunststoffen (Polystyren, Polypropylen, Polycarbonat, Polyvinylchlorid). Nach dieser spontanen Bindung werden alle unbesetzten Bindungsstellen durch den BSA-Anteil der Absättigungslösung besetzt. In den folgenden Schritten läßt man das Protein zunächst mit einem spezifischen Antikörper, sodann diesen mit einem an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Anti-Antikörper reagieren, der seinerseits speziesspezifische Immunglobuline erkennt und der in einer Färbereaktion mit ABTS als Substrat sichtbar gemacht wird (Engvall und Perlmann 1972, Crowther und Abu-el Zein, 1979). Dieser Test ist sehr sensitiv (die Nachweisgrenze liegt im Nanogrammbereich), schnell und zuverlässig und eignet sich somit sehr gut für das Austesten einer großen

Probenanzahl wie der Seren der zahlreichen infizierten Mäuse im Rahmen der vorliegenden Arbeit. Eine zusätzliche Steigerung der Sensitivität kann durch Anwendung des "Sandwich-ELISA" erreicht werden. Die Bindung des monoklonalen Antikörpers an die Festphase der ELISA-Platte mit nachfolgender Zugabe seines Antigens und weiterem Vorgehen wie im 'direkten ELISA' bewirkt eine Minimierung unspezifischer Hintergrundreaktionen (Katze and Crowell 1980, Schönke 1988).

Alle aufgeführten Verdünnungen, Volumina, Inkubationszeiten und -temperaturen sind identisch für die verschiedenen Formen dieses Tests und werden deshalb nur einmal aufgeführt.

Lösung	Verdünnung	Menge pro well	Inkubations- zeit	Tempe- ratur
Antigen	4 µl/ml	50 µl	direkter ELISA: über Nacht, sonst 2 h	37°C 37°C
1 x waschen mit dem Waschpuffer				
Absättigungs- lösung		100 µl	30 min	37°C
1 x waschen mit dem Waschpuffer				
Antikörper (polyklonale Seren)	1:2	50 µl	2 h	37°C
Hybridoma- überstände	unver- dünnt	100 µl	Sandwich-ELISA: über Nacht	37°C
1 x waschen mit Waschpuffer				
Anti-anti- körper	1:500	50 µl	2 h	37°C
2 x waschen mit Waschpuffer				
1 x waschen mit PC-Puffer				
ABTS-Färbe- lösung	1 mg/ml	150 µl	30 min	RT

Die Waschschrirte dienen dazu, alle nicht gebundenen Reaktanten zu entfernen und Hintergrundreaktionen zu minimieren. Die Meerrettich-Peroxidase setzt ihr Substrat (ABTS) mit Hilfe von H_2O_2 um und es kommt zur Farbreaktion, deren Intensität bei 405 nm gemessen werden kann.

2.3 E R G E B N I S S E

2.3.1 Standardisierung der Nick-Translation durch Optimierung der KpnI- und Bam HI-Fragmentlänge

In der Nick-Translation erzeugt die DNase I nahe beieinander liegende 'nicks' in beiden Strängen der Doppelstrang-DNA, sodaß sich im Laufe der Reaktion Bruchstücke der ursprünglich eingesetzten cDNA-Fragmente bilden. Die Länge dieser Bruchstücke kann durch Variation der eingesetzten Menge an DNase I beeinflusst werden. Beträgt die Länge dieser Bruchstücke jedoch mehr als 400 Nukleotide, verringert sich dadurch ihre Fähigkeit in die Zellen zu diffundieren (Haase et al. 1984). Somit hängt die Effizienz der in situ Hybridisierung ganz wesentlich von der Verwendung von ^{35}S -markierten cDNA-Fragmenten konstanter Länge ab.

Zur Ermittlung der optimalen Translationsbedingungen wurde zunächst der Einfluß der DNase-Konzentration auf die Fragmentlänge gemessen. Dabei bewirkte eine steigende DNase-Konzentration die kontinuierliche Verkürzung der durchschnittlichen Länge der cDNA-Fragmente KpnI und Bam HI.

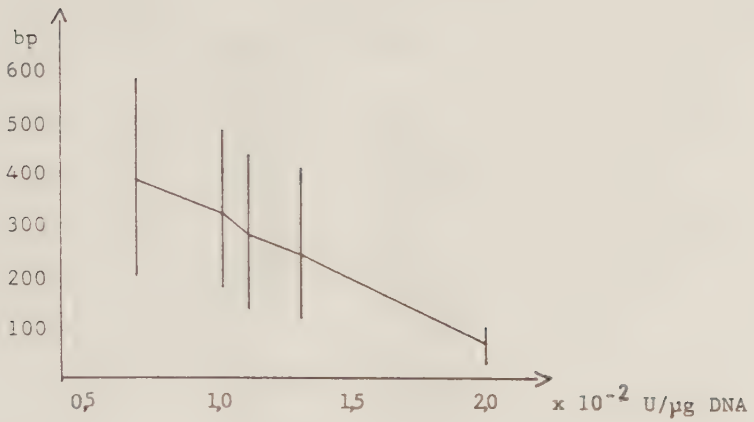


Abb. 3 : Abhängigkeit der Fragmentlänge des KpnI cDNA-Fragmentes von der DNase-Konzentration in der Nick Translation. Aufgrund der hier ermittelten Ergebnisse wurde bei allen Nick Translationen im Rahmen dieser Arbeit eine DNase-Konzentration von ca. $10^{-2} \text{ U}/\mu\text{g DNA}$ gewählt, da hiermit eine optimale Fragmentlänge von 150-400 bp erreicht wurde. Die Beurteilung erfolgte anhand der gelelektrophoretischen Auftrennung der entstandenen Bruchstücke.

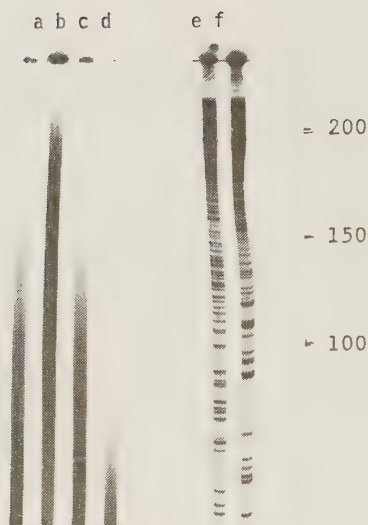


Abb. 4 : Gelelektrophoretische Auftrennung der erzeugten radioaktiv markierten CVB3 cDNA-Fragmente Kpn I und Bam HI mittels eines 6%igen Polyacrylamidgels (32 Watt, 1500 V für 2 Stunden). Aufgetragen wurden 3×10^5 cpm je Probe.

- | | |
|---|--|
| a = Bam HI: $1,1 \times 10^{-2}$ U/ μ g DNA | d = Kpn I: $2,5 \times 10^{-2}$ U/ μ g DNA |
| b = Kpn I: $1,3 \times 10^{-2}$ U/ μ g DNA | e = Sequenzier-(T-)reaktion |
| c = Kpn I: 2×10^{-2} U/ μ g DNA | f = Sequenzier-(G-)reaktion |

Eine Kinetik der Nick Translation machte ferner deutlich, daß eine steigende Inkubationsdauer bis zu 2,5 Stunden eine Erhöhung der spezifischen Aktivität der 35 S-markierten cDNA-Probe bewirkt. Darüberhinaus waren rückläufige Werte zu verzeichnen. Ihr Maximum erreichte die spezifische Aktivität bei $7,4 \times 10^8$ cpm/ μ g DNA.

2.3.2 Versuche zur Optimierung der in situ Hybridisierung

Objektträgerbeschichtung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden auch Untersuchungen zur Objektträgerbeschichtung durchgeführt. Es hatte sich gezeigt, daß bei der üblichen Beschichtung der Objektträger mit Denhardt's Lösung (Denhardt 1966) (0,02% Bovines Serumalbumin, 0,02% Polyvinylpyrrolidon, 0,02% Ficoll) bei nicht vollständig getrockneten Kryoschnitten sowie vor allem in Lösungen hoher Salzkonzentration (z.B. $2\times$ SSC bei 55°C) die Gefahr bestand, daß sich Schnitte ablösten. Im Gegensatz dazu erbrachte die Variation der Objektträgerbeschichtung in nachfolgend beschriebener Weise eine entscheidende Verbesserung im Sinne einer durchgängig besseren Haftung der Gefrierschnitte. Im Unterschied zum bisher angewendeten Verfahren werden die Objektträger hier einer Reinigung in alkalischer Waschlösung unterzogen und anschließend silanisiert.

Verändertes Verfahren zur Objektträgerbeschichtung:

- Objektträger autoklavieren
- über Nacht in 10% Extran einlegen
- 2 Stunden in fließendem Leitungswasser spülen
- waschen in Aqua dest.
- waschen in Aqua bidest.
- trocknen bei 160°C , 30 min
- 5 Sekunden tauchen in 2% 3-Aminopropyltriethoxysilan
- 2 x waschen in Aceton
- waschen in Aqua dest.
- lufttrocknen

Bei dieser Gelegenheit darf auch erwähnt werden, daß die Reinigung der Objektträger sowie der Deckgläser anstatt mit absolutem Alkohol ohne Nachteile mit dem wesentlich kostengünstigeren technischen Alkohol ausgeführt werden kann. Wie aus einem Doppelansatz mit 20 Proben sowie den gesamten Ergebnissen der in situ Hybridisierungen in vorliegender Arbeit hervorgeht, übt das Vergällungsmittel (Petroläther) keinen schädlichen Einfluß auf die nachfolgende in situ Hybridisierung aus.

Optimierung der Posthybridisierungsphase

Die hohe Sensitivität der in situ Hybridisierung ermöglicht den Nachweis weniger viraler Kopien pro Zelle, wobei zum Beispiel mit einer ^{35}S -markierten DNA-Sonde (spez. Aktivität zumindest $1 \times 10^6 \text{ cpm}/\mu\text{g DNA}$) 20 virale Kopien pro Zelle sicher detektiert werden können (Kandolf et al. 1987a). Um dies zu erreichen, ist eine lange Exponierungsdauer von zwei Wochen sowie ein effizientes Waschen der Proben im Anschluß an die Hybridisierung nötig (Haase et al. 1984). Eine mehrfache Variation dieses Waschschrittes zeigte deutlich, daß vor allem die Stringenz der Posthybridisierungsbedingungen und weniger die Waschkdauer hierbei von großer Bedeutung ist. So konnte durch mehrfaches Wechseln des Waschpuffers (50% Formamid, 10mM Tris, 1mM EDTA, 600mM NaCl) innerhalb eines Tages eine Minimierung der unspezifischen Hintergrundreaktionen erreicht werden, anstatt wie bisher in zwei Tagen. Des weiteren konnte beobachtet werden, daß die Temperatur der Waschlösung einen nur geringen Einfluß auf die Spezifität ausübt. Im Bereich zwischen 23°C und 35°C konnten keine Unterschiede in der Qualität der Hybridisierungsergebnisse festgestellt werden. Zum Zwecke der Stabilisierung der radioaktiv markierten cDNA-Probe wurde der Waschlösung ferner 1mM DTT zugesetzt.

2.3.3 Vergleich der akuten und chronischen Phase der CVB3 Infektion des Herzens in neun Inzuchtmäusestämmen unter Berücksichtigung des Einflusses von Infektionsalter und Geschlecht der Tiere

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit erfolgte die vergleichende Untersuchung der akuten Phase der CVB3 Infektion in neun ingezüchteten Mäusestämmen (acht immunkompetente und ein immuninkompetenter Stamm). Die Tiere stammten aus eigener Nachzucht, wodurch sich unterschiedliche Zahlen infizierter Tiere je Geschlecht und Stamm erklären. Die Mäuse wurden zunächst im Alter von 6-8 Wochen mit 2×10^4 PFU CVB3 intraperitoneal infiziert und innerhalb von 5-10 Tagen post infectionem (p.i.) getötet. Von jedem der Herzen wurden 20-25 Gefrierschnitte angefertigt und untersucht. Als Positivkontrollen dienten Myokardschnitte von nachweislich positiven Mäusen, als Negativkontrollen wurden Myokardschnitte der zu testenden Proben mit ^{35}S -markierter Plasmid-DNA (p2732B) hybridisiert. Auf diese Weise gelang die Etablierung eines Modellsystems dieser akuten Phase der Infektion in fünf der neun Mäusestämme. Dabei konnten weder Störungen des Allgemeinbefindens hinsichtlich Haltung und Verhalten oder gar Todesfälle beobachtet werden, noch zeigten sich nach der Tötung der Tiere abnorme pathologisch-anatomische Befunde, mit Ausnahme der Tiere des A.CA/Sn-Stammes. Bei nahezu allen untersuchten Tieren dieses Stammes waren makroskopisch auffällige, bis zu hirsekorngroße Verkalkungsherde vor allem im Myokard des linken Ventrikels zu finden. Die Mehrzahl der Tiere wies zudem eine gering- bis mittelgradige Pericarditis auf. Bei Infektion mit höherer Dosis (5×10^4 PFU) traten diese Befunde auch bei Mäusen des A.BY/SnJ- und A.SW/SnJ-Stammes gehäuft auf. Die übrigen Stämme verhielten sich pathologisch-anatomisch fast ausnahmslos unauffällig, abgesehen von einigen Fällen einer Pericarditis bzw. Pericardfibrose innerhalb des DBA/2J-Stammes, die allerdings auch in der Kontrollgruppe zu finden war und demnach wohl eher im Sinne einer idiopathischen, genetisch bedingten Spontanreaktion zu bewerten ist.

Empfänglichkeit für die CVB3 Infektion für alle Altersgruppen eines Mäusestammes annähernd einheitlich ist. Dies soll am Beispiel zweier Stämme näher gezeigt werden: erwiesen sich 85% der untersuchten Mäuseherzen von akut infizierten, 7 Wochen alten Tieren des PL/J-Stammes in der in situ Hybridisierung als positiv, so waren es bei den untersuchten Babymäusen (am 2. Lebenstag infiziert, am 6. Lebenstag getötet) über 90%. Bei den Mäusen des SJL/J-Stammes dagegen waren entsprechend 43% der adoleszenten Gruppe gegenüber 50% bei den Babymäusen zu verzeichnen. Ähnlich verhielten sich die Ergebnisse der in situ Hybridisierung nach der Infektion von adulten Mäusen. Hinsichtlich des Geschlechtes konnten signifikante Unterschiede weder in der Empfänglichkeit für die Infektion noch in der Schwere der Erkrankung festgestellt werden.

In der Untersuchung der chronischen Phase der Myokarditis war die Rückisolierung von infektiösem CVB3 zumindest in einem Fall noch 60 Tage p.i. möglich. Bei einigen wenigen DBA/2J- und SJL/J-Mäusen waren noch 90 Tage p.i. nach der in situ Hybridisierung autoradiographische Signale im Myokard zu finden, die auf eine Persistenz viraler RNA hindeuten. Allerdings handelt es sich auch hier um seltene Ereignisse in einer Häufigkeit von 0,5-1/Schnitt* (siehe Tab. 1, Seite 54).

In situ Hybridisierung

Die vergleichende Untersuchung der CVB3 Infektion des Herzens von neun Inzuchtmäusestämmen ermöglichte die Etablierung eines Tiermodelles der akuten viralen Herzerkrankung des Menschen in der immunkompetenten Maus. Die Variationsbreite der mit Hilfe der in situ Hybridisierung erzielten Ergebnisse erstreckt sich mäusestammspezifisch von nur wenigen einzelnen infizierten Myozyten bis hin zu klusterförmigen Ansammlungen von infizierten Zellen, die deutlich den Untergang des betroffenen Gewebes erkennen lassen (siehe Abb. 8 und 9). Übersichtsdarstellungen vermögen dieses multifokale und disseminierte Verteilungsmuster anschaulich zu belegen (siehe Abb. 5). Aus konsekutiven Längsschnitten des Myokards gewinnt man den Eindruck, daß sich die Infektion durch direkten Zellkontakt aus Bereichen starker Virusreplikation in gesunde Gewebebezirke vorarbeitet (siehe Abb. 6 und 7).

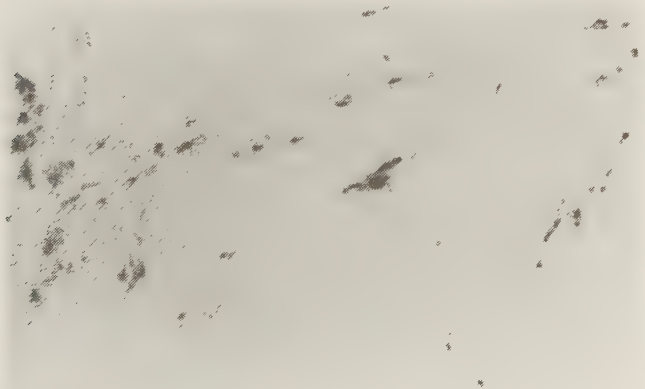


Abb. 5: Myokardialer Gewebeschnitt einer männlichen A.CA/Sn-Maus acht Tage nach CVB3 Infektion nach erfolgter in situ Hybridisierung und Autoradiographie (Exponierungsdauer 10 Tage). Vergrößerung: x 50.

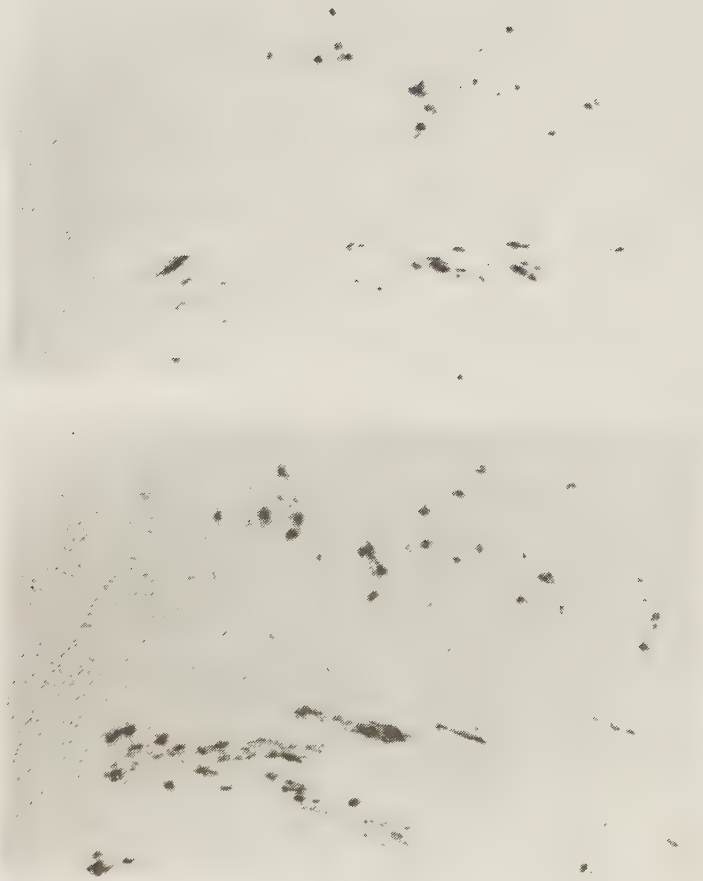


Abb. 6 und 7: Konsekutive Autoradiographien vom Myokard einer weiblichen A.SW/SnJ-Maus acht Tage nach CVB3 Infektion. Die Mehrzahl der autoradiographischen Signale findet sich in beiden Abbildungen, wobei in den längsgeschnittenen Myokardabschnitten ein Übergreifen der Infektion auf benachbarte Zellen in Abb. 7 zu erkennen ist. Vergrößerung: x 50.



Abb. 8: Ausschnittvergrößerung aus Abb. 7. Ansammlung infizierter Myozyten mit Nekrose der benachbarten Zellen. Vergrößerung: x 200.

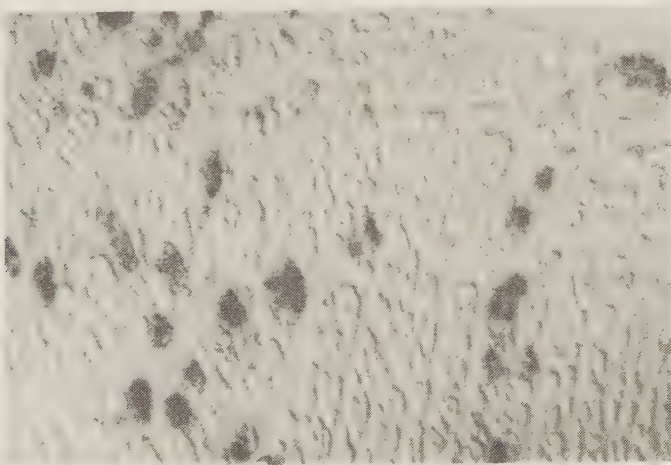


Abb. 9: Autoradiographie des myokardialen Querschnittes einer weiblichen A.BY/SnJ-Maus sechs Tage nach CVB3 Infektion. Multifokale, umschriebene Infektion einzelner Zellen. Vergrößerung: x 220.

Legt man die Zahl infizierter Zellen pro Schnitt als Maßstab für eine Einteilung der Mäusestämme an, zeichnen sich zwei konträre Gruppen ab. Die erstere Gruppe umfasst die folgenden Stämme: SJL/J, DBA/1J, DBA/2J, NuNu/NMRI, während der zweiten alle verbleibenden untersuchten Stämme, also A.BY/SnJ, A.CA/Sn, A.SW/-SnJ, PL/J, und SWR/J angehören. Daraus ergeben sich gewisse Schwierigkeiten in der Interpretation der Ergebnisse, da unter einem positiven Nachweis viraler RNA beispielsweise innerhalb des SJL/J-Stammes mit 0,5-3 infizierten Zellen pro Myokardschnitt etwas vollkommen anderes zu verstehen ist als etwa im Falle des SWR/J-Stammes, für den durchschnittlich 25-35 infizierte Zellen pro Schnitt charakteristisch sind. Dieselbe Klassifizierung ergibt sich auch wenn die Einteilung der neun Mäusestämme nach Inzidenz der experimentell durch CVB3 erzeugten Myokarditis erfolgt (siehe Tab. 1). Dabei gelang in der ersten Gruppe von Mäusestämmen die Detektion von viraler RNA im Myokard (innerhalb der akuten Phase der Infektion) in 23-31% der Fälle, während sie in der zweiten Gruppe in 69-91% der Herzen möglich war. Aus Tabelle 1 wird auch ersichtlich, daß virale RNA bei experimenteller Infektion vorwiegend in den ersten zehn Tagen der Infektion nachweisbar war, wohingegen dies zu einem späteren Zeitpunkt nur in einzelnen Fällen gelang. Entgegen den Berichten von Lyden et al. 1987b konnten bei den durchgeführten Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren hinsichtlich der Empfänglichkeit für die CVB3 Infektion festgestellt werden.

Tab. 1: Häufigkeit der Tiere mit detektierbarer viraler RNA während der akuten und chronischen Phase der CVB3 Infektion anhand der in situ Hybridisierung.

Stamm mit Infektionsdauer	Anzahl der Tiere mit positivem Ergebnis		
	männl.	weibl.	gesamt
DBA/1J			
4.-5.Tag	3/5	2/6	5/11(45%)
10.Tag	0/4	0/3	0/7
20.Tag	1/1	1/1	2/2
36.Tag	n.b.	1/2	
90.Tag	n.b.	0/3	
DBA/2J			
4.-5.Tag	3/7	2/4	5/11 (45%)
8.-10.Tag	1/5	0/3	1/8
15.-60.Tag	0/9	0/4	0/11
90.Tag	0/8	1/9	1/17 (5%)
A.CA/Sn			
4.-5.Tag	1/1	2/2	3/3
8.-10.Tag	2/2	2/2	4/4
12.Tag	1/2	2/2	3/4
19.Tag	1/2	0/1	1/3
26.Tag	0/3	n.b.	
A.BY/SnJ			
4.-5.Tag	4/6	5/6	9/12 (75%)
8.-9.Tag	2/4	n.b.	
42.Tag	0/2	0/2	0/4
A.SW/SnJ			
4.-5.Tag	7/7 (100%)	4/4	11/11 (100%)
8.-10.Tag	3/4	2/3	5/7
30.-60.Tag	0/4	0/2	0/6
70.Tag	1/2	n.b.	
90.Tag	0/5	n.b.	
PL/J			
4.-5.Tag	2/2	2/2	4/4
8.-10.Tag	4/4	2/3	6/7
60.Tag	0/5	0/4	0/9

	männl.	weibl.	gesamt
SJL/J			
4.-5.Tag	2/7 (28%)	2/5	4/12 (33%)
10.Tag	0/2	0/3	0/5
20.-60.Tag	0/7	0/3	0/10
90.Tag	1/6	1/2	2/8
NuNu/NMRI			
4.-5.Tag	2/6	1/2	3/8 (37%)
8.-10.Tag	0/1	0/2	0/3
15.-90.Tag	0/7	0/3	0/10
SWR/J			
5.Tag	4/4	3/3	7/7
7.Tag	3/3	2/2	5/5
8-10.Tag	7/9 (77%)	1/4	8/13 (61%)

3.2. Pathologisch-histologische Untersuchung

Für die histologische Untersuchung wurde im Anschluß an die Entnahme der Herzen aus dem Tierkörper ein ca 0,5-1 mm dicker Querschnitt hiervon in PLP (2% Paraformaldehyd/0,075 M Lysin/0,01 M NaIO₄/0,037 M Phosphatpuffer, pH 7,5) fixiert. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei 4°C, beziehungsweise bei Raumtemperatur bis zur Anfertigung der Paraffinschnitte, die, ebenso wie die Beurteilung, freundlicherweise im Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Universität Heidelberg durchgeführt wurde. Auch hierbei fanden sich weitreichende Unterschiede hinsichtlich der Art und des Ausmaßes der Myokardveränderungen. Während zwar die Mehrzahl der infizierten Tiere histologisch das typische Bild einer akuten Myokarditis mit interstitiellen Infiltraten von Entzündungszellen zwischen die Herzmuskelfasern boten, zeigten Vertreter des SWR/J-, A.SW/SnJ- und des A.CA/Sn-Stammes umfangreiche, multifokal gelegene Verkalkungszonen mit Gewebsuntergang (siehe Abb.10). In der chronischen Phase der Erkrankung konnten Narbenfelder mit schwerer myokardialer Fibrose nachgewiesen werden (siehe Abb. 10 und 11). Die entsprechenden elektronenmikroskopischen Befunde ließen umfangreiche Myofibrillenverluste, Cristolyse und völlige Verkalkung der Mitochondrien erkennen (siehe Abb. 12-15).

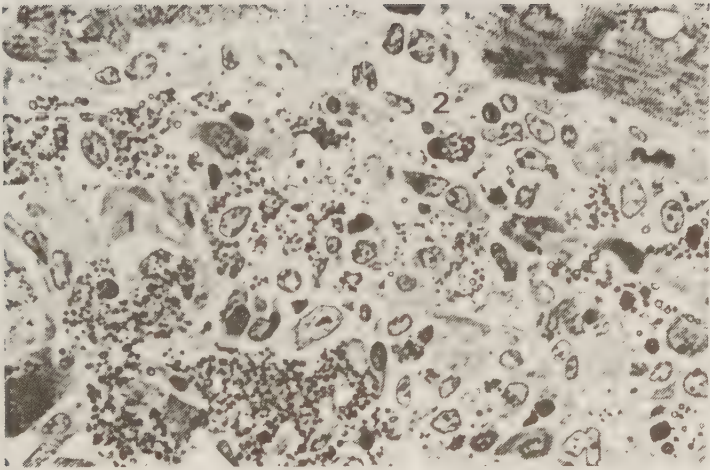


Abb. 10: Lymphoplasmazelluläre Infiltration des Myokards einer A.CA/Sn-Maus acht Tage nach CVB3 Infektion mit ausgeprägter Verkalkung (1) und Fibrosierung (2). Färbung: Methylenblau - basisches Fuchsin. Vergrößerung: x 428.

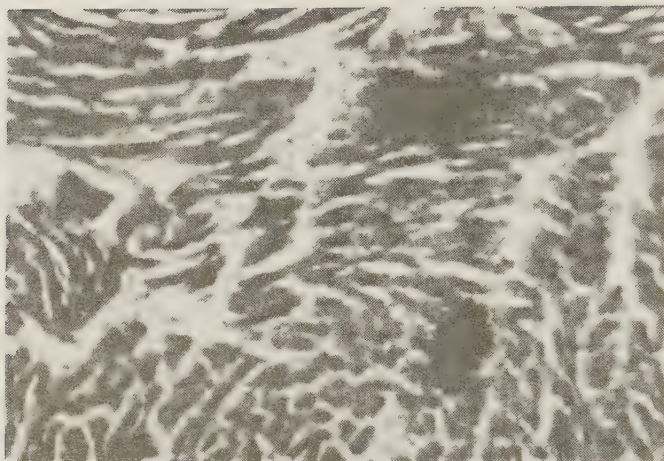


Abb. 11: Paraffinschnitt myokardialen Ursprungs (A.CA/Sn-Maus, 12 Tage nach Infektion), nach erfolgter in situ Hybridisierung mit Methylenblau-Azophloxin gefärbt. Fibroseherde in der Umgebung infizierter Zellen. Vergrößerung: x 200.

Die Stärke der autoradiographischen Signale ist ein Beleg für die Replikation von CVB3 in hoher Kopienzahl.

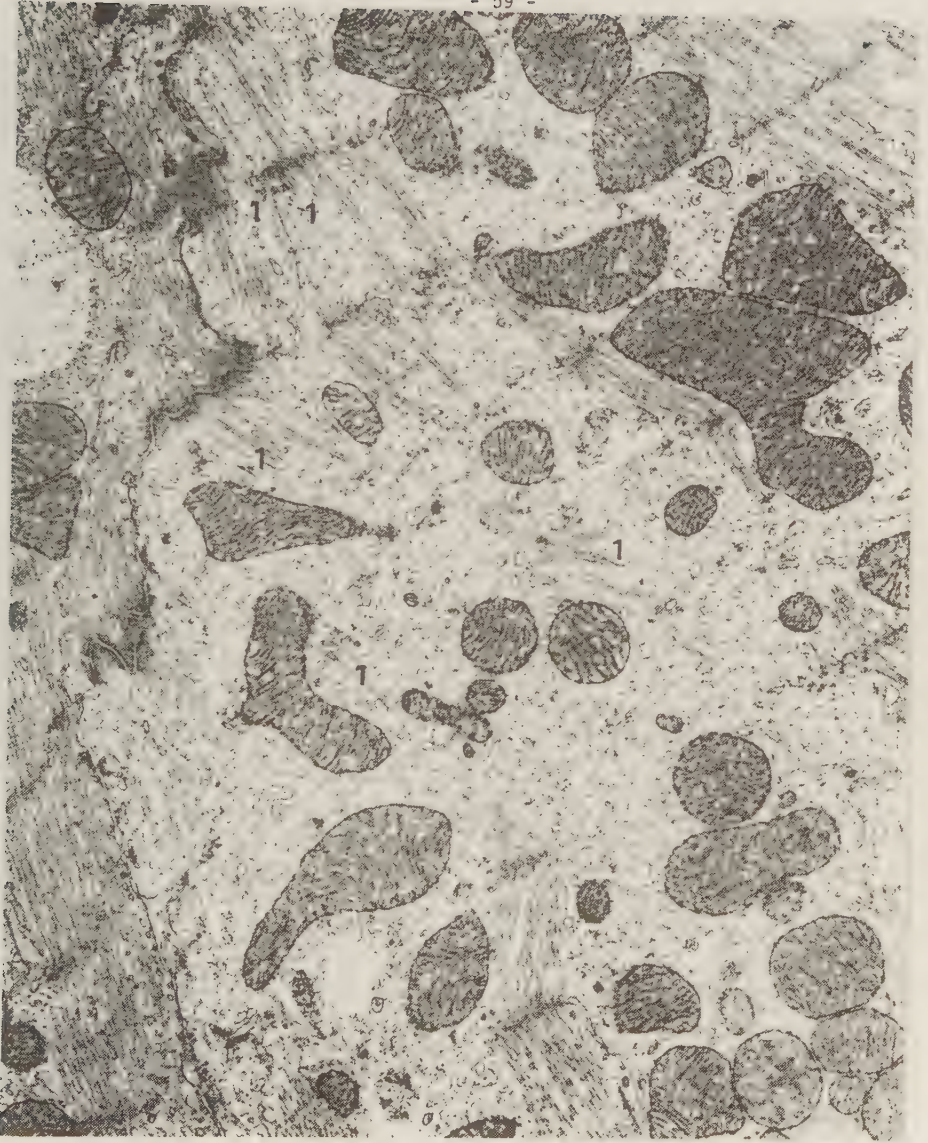


Abb. 12: Elektronenmikroskopische Untersuchung des Myokards einer A.CA/Sn-Maus acht Tage nach CVB3 Infektion. Ausgeprägter Myofibrillenverlust. Vergrößerung: x 13200.

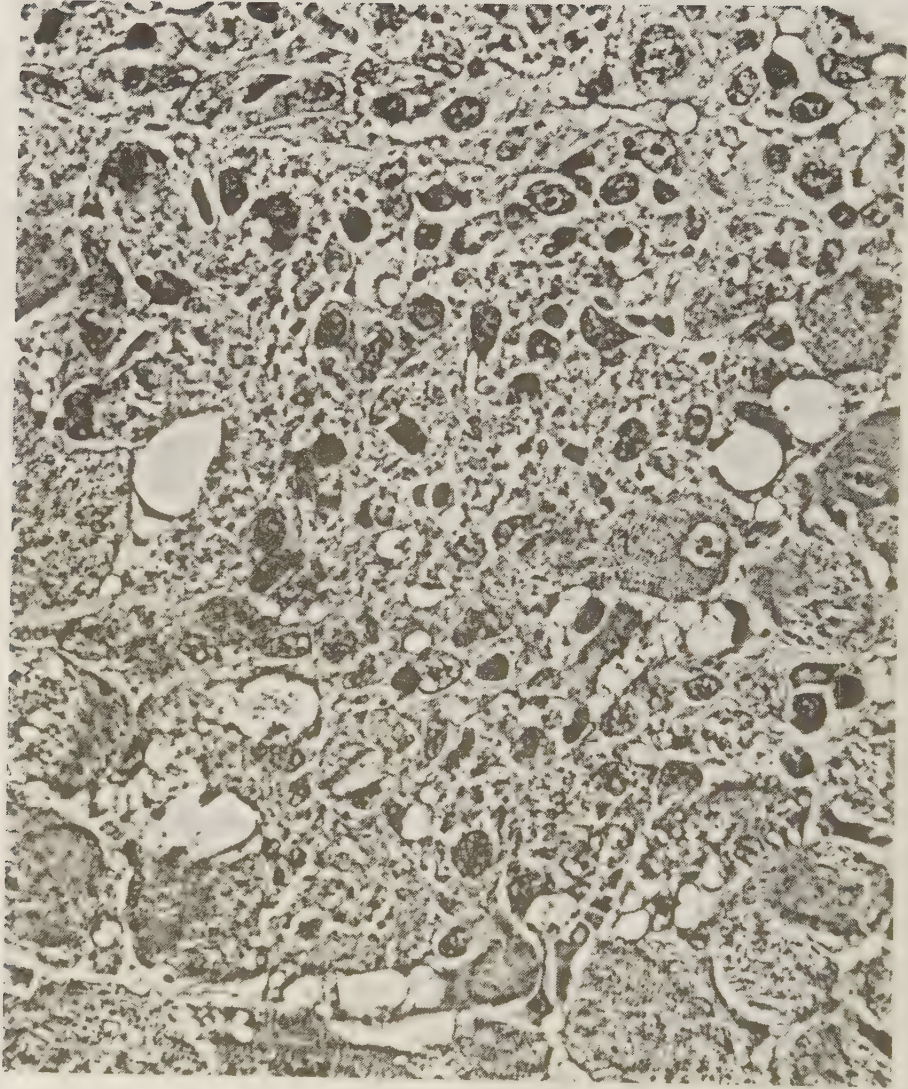


Abb. 13: Lichtmikroskopische Untersuchung des Myokards einer A.CA/Sn-Maus sechs Tage nach CVB3 Infektion. Ausgeprägter Myofibrillenverlust (1), lymphoplasmazelluläre Infiltration (2) und Kalkeinlagerungen (3). Vergrößerung: x 1000.

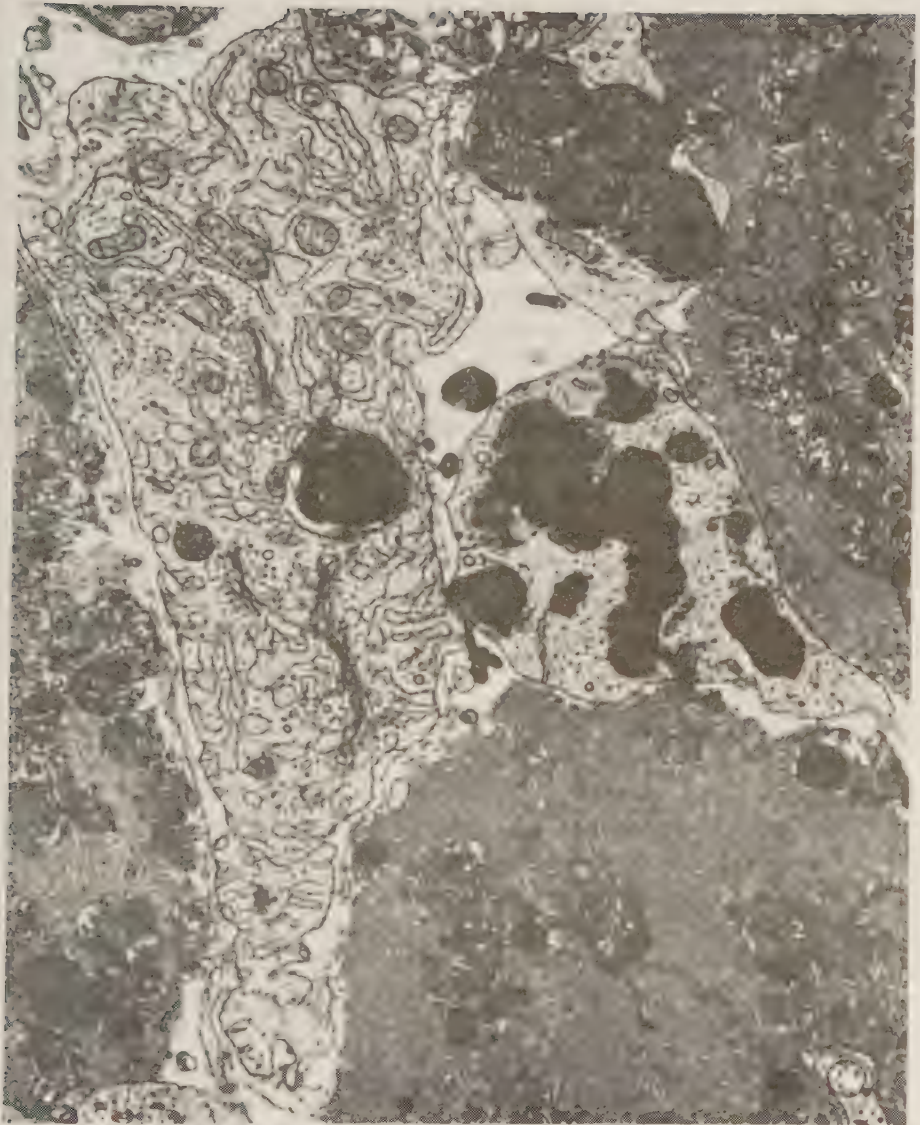


Abb. 14: Ultrastrukturelle Untersuchung des Myokards einer A.SW/SnJ-Maus acht Tage nach CVB3 Infektion. Unterschiedliche Stadien der Verkalkung der Mitochondrien mit einhergehender Cristolyse (1). Vergrößerung: x 21000.

Pathologische Anatomie

Bei der Sektion der CVB3 infizierten Mäuse waren vor allem eine Perikarditis sowie Verkalkungen unterschiedlichen Ausmaßes bei den Mäusen des A.SW/SnJ-, A.CA/Sn- und A.BY/SnJ-Stammes zu beobachten. Die Verkalkungen stellten sich makroskopisch als abgekapselte, weißliche, bis zu hirsekorngroße Herde dar, die transmural gelegen waren. Die Mäuse der übrigen Stämme zeigten einen unauffälligen Befund des Herzens, mit Ausnahme der schon erwähnten häufigeren Fälle einer Perikarditis bzw. Perikardfibrose bei den DBA/2J-Mäusen.

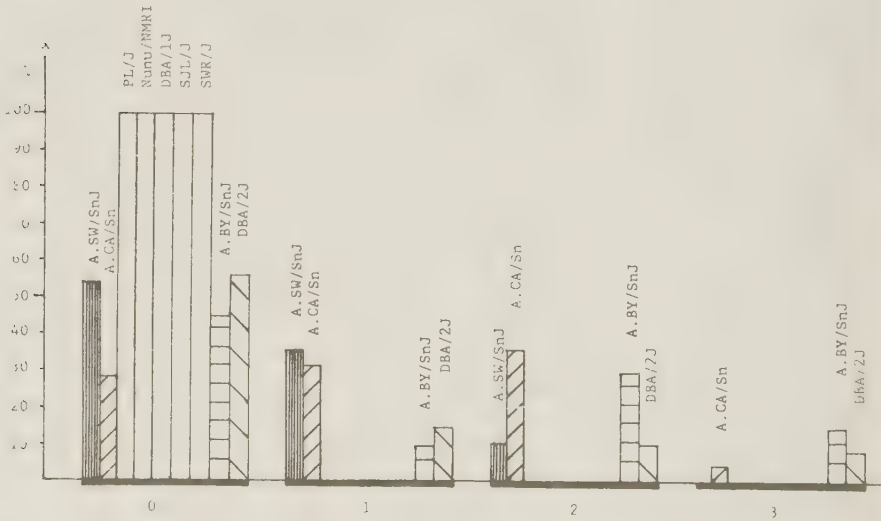


Abb. 15: Pathologisch-anatomische Befunde nach CVB3 Infektion der verschiedenen Mäusestämme, eingeteilt in drei Schweregrade.

- 1 = Perikarditis als stippenartige Veränderungen sichtbar
- 2 = Perikarditis erstreckt sich über die Hälfte der Herzoberfläche
- 3 = Perikarditis erstreckt sich über mehr als die Hälfte der Herzoberfläche

2.3.4. Rückisolierung infektiöser CVB3 Partikel aus dem Herzen infizierter Mäuse

Nach der in Kapitel 2.2.6 beschriebenen Methode wurde versucht, im homogenisierten basisseitigen Herzdrittel CVB3 infizierter Mäuse infektiöse Viruspartikel nachzuweisen. Wie aus Tab. 2 hervorgeht, zeigten die neun Mäusestämme große Unterschiede in der Rückisolierbarkeit des Virus innerhalb der akuten Phase der Erkrankung (4.-10.Tag). Bei PL/J-, A.SW/SnJ-, A.BY/SnJ-, A.CA/Sn- sowie der SWR/J-Mäusen war diese in 66-100% der Herzen möglich. Diese Stämme weisen sich angesichts dieser Ergebnisse als Stämme mit hoher Empfänglichkeit für die CVB3 Infektion aus, während DBA/1J-, DBA/2J-, SJL/J-, und NuNu/NMRI-Mäuse dagegen eine nur geringe Empfänglichkeit besitzen. Abb. 16 verdeutlicht die rasche Abnahme der Virusrückisolierbarkeit noch innerhalb der akuten Phase der Infektion. Nur der PL/J- und der A.CA/Sn-Stamm wiesen noch am 10.Tag nach Infektion eine gleich hohe Rückisolierbarkeit auf wie am 5. Tag p.i..

Nach dem 10. Tag p.i. konnten in insgesamt vier Herzen infektiöse CVB3-Partikel rückisoliert werden, darunter in einem Fall sogar noch am 60.Tag der Infektion. Es muß hierbei berücksichtigt werden, daß die Detektierbarkeit infektiöser Partikel noch verbessert werden könnte, indem vor der Inkubation der homogenisierten Gewebeprobe in Verozellen eine Dissoziation von Virus-Antikörper-Komplexen durchgeführt würde, da die Anwesenheit neutralisierender Antikörper einen Nachweis infektiöser Viruspartikel behindern kann (Rager-Zisman and Allison 1973, Cao et al. 1984, Kawai et al. 1987). Zudem könnte auch der Einsatz einer Zelllinie höherer Permissivität für das CVB3 in der Rückisolierung die Sensitivität dieses Testes erhöhen.

Tab. 2: Rückisolierung von CVB3 aus dem Herzen von CVB3 infizierten
Mäusen verschiedener Stämme

Mäusestamm mit Infektionsdauer	Anzahl positiver Proben/ Gesamtzahl an Proben		
	männl.	weibl.	gesamt
DBA/1J			
4.-5. Tag	3/6	3/5	6/11(55%)
10. Tag	0/2	0/1	0/3
12.-90.Tag	0/5	0/11	0/16
DBA/2J			
4.-5.Tag	3/5	1/3	4/8
8.-10.Tag	1/3	3/3	4/6
15.-90.Tag	0/9	0/19	0/28
A.CA/Sn			
4.-5.Tag	2/2	2/2	4/4
8.-10.Tag	0/2	2/2	2/4
12.Tag	0/2	2/2	2/4
19.Tag	0/2	1/1	1/3
26.Tag	0/3	n.b.	
A.BY/SnJ			
4.-5.Tag	4/5	5/6	9/11 (81%)
8.-9.Tag	2/4	n.b.	
42.-50.Tag	0/2	0/2	0/4
A.SW/SnJ			
4.-5.Tag	6/6	3/3	9/9 (100%)
8.-10.Tag	3/3	1/1	4/4
30.Tag	0/3	0/2	0/5
60.Tag	1/2	n.b.	
90.Tag	0/5	n.b.	
PL/J			
5.Tag	2/2	2/2	4/4
9.-10.Tag	4/4	3/3	7/7
60.Tag	0/5	0/4	0/9

	männl.	weibl.	gesamt
SJL/J			
4.-5.Tag	3/5	2/4	5/9 (55%)
10.Tag	2/3	0/2	2/5
20.Tag	1/1	n.b.	
30.-90.Tag	0/9	0/3	0/12
NuNu/NMRI			
4.-5.Tag	8/12 (66%)	n.b.	
8.-10.Tag	2/5	0/2	2/7
60.-90.Tag	0/3	n.b.	
SWR/J			
5.Tag	4/4	3/3	7/7
8.-10.Tag	9/12 (75%)	2/5	11/17 (64%)

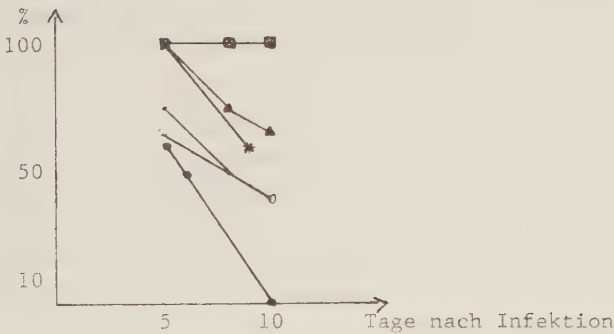


Abb. 16: Graphische Darstellung der Isolierbarkeit infektiöser CVB3-Partikel aus dem Herzen infizierter Mäuse während der akuten Phase der Infektion. Dargestellt sind die Ergebnisse von
 ▲ SWR/J, × A.SW/SnJ, □ PL/J, * A.CA/Sn, ● A.BY/SnJ, ○ DBA/1J,
 • Nunu/NMRI

2.3.5 Detektion von Serumantikörpern gegen die Polymerase und die Hüllproteine VP1 und VP4/2/3 im ELISA

Mit Hilfe des ELISAs war es möglich, im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Probenanzahl von 246 Seren in Doppelansätzen auf die Anwesenheit von Antikörpern gegen die Antigene VP1, VP4/2/3 und virale Polymerase zu überprüfen. Hierfür wurde das Blut der CVB3 infizierten Tiere sofort nach der Tötung gesammelt und das daraus gewonnene Serum zunächst in einem ersten Schritt im 'direkten ELISA' getestet (siehe Abschnitt 2.2.10). Aus arbeitstechnischen Gründen wurden diese Seren in einer 1:10-Verdünnung eingesetzt, so daß sich positive Ergebnisse auf einen Antikörpertiter von 1:10 beziehen. Diejenigen Seren, die sich in diesem Test negativ verhielten, wurden zur weiteren Steigerung der Sensitivität zusätzlich im 'Sandwich-ELISA' geprobt. Als positiv wurden die Seren gewertet, deren Meßwerte, inklusive Doppelansätze, mindestens 0,1 Absorptionseinheiten über dem Mittelwert der Negativkontrollen von 0,05 Absorptionseinheiten lagen. Als Negativkontrollen wurden Bakterienlysate von Klonen ohne Induktion der Expression der viralen Proteine VP1, VP4/2/3, als Positivkontrolle die bakteriellen Expressionsproteine nach der Induktion an die Festphase der ELISA-Platte gebunden und mit dem polyklonalen Antiserum vom Kaninchen detektiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß alle untersuchten Mäusestämme eine Immunantwort unterschiedlicher Stärke gegen die viralen Hüllproteine sowie gegen die virale Polymerase entwickeln, die schon nach den ersten fünf Tagen der Infektion zu meßbaren Antikörpertitern führt und über drei Monate verfolgt werden kann (siehe Abb. 17). Die verschiedenen Mäusestämme weisen einheitlich eine mit der Infektionsdauer steigende Antikörperproduktion auf, wobei vor allem in der chronischen Phase der CVB3 Infektion eine führende Position der A/J-Stämme (A.SW/SnJ, A.CA/Sn, A.BY/SnJ) zu erkennen ist. Demnach scheinen diese Inzuchtlinien nicht nur eine hohe Empfänglichkeit für die CVB3 Infektion, sondern auch eine starke Wirtsabwehr zu besitzen. Als zusätzliche Beobachtung muß erwähnt werden, daß die in situ Hybridisierung bei mehreren antikörperpositiven Mäusen ein negatives Ergebnis erbrachte und umgekehrt. Dagegen war eine Detektion von Antikörpern und viraler RNA in Proben vom gleichen Tier nur selten möglich.

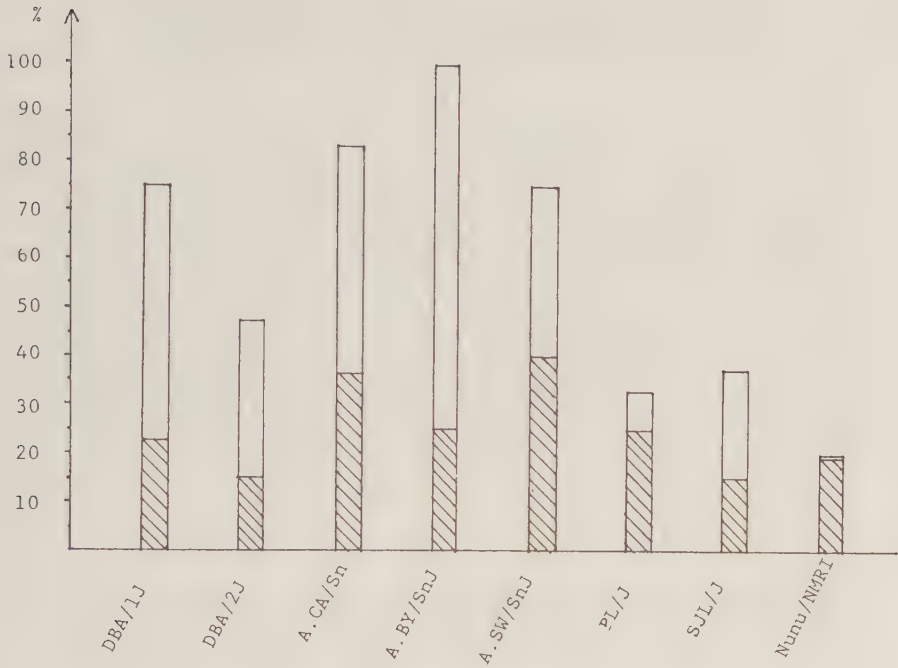


Abb. 17: Antikörperproduktion der verschiedenen Mäusestämme gegen die viralen Hüllproteine oder die Polymerase während der akuten und chronischen Phase der CVB3 Infektion.
schraffiert = AK-Produktion in der akuten Phase,
weiß = AK-Produktion in der chronischen Phase der Erkrankung

2.3.6 Untersuchung weiterer Organe von CVB3 infizierten Mäusen mittels der in situ Hybridisierung

Als Zielorgane der CVB3 Infektion in der Maus werden außer dem Herzen auch Leber, Milz, Pancreas und Gehirn beschrieben (Woodruff 1980, Crowell et al. 1988). Dazu wurden auch eigene Untersuchungen durchgeführt, indem von infizierten Tieren aus verschiedenen Stämmen Proben von Leber, Milz, Pancreas, Niere, Gehirn, Lunge, Muskel und Thymus anhand der in situ Hybridisierung auf die Anwesenheit viraler RNA getestet wurden. Dabei wiesen vor allem Leber, Milz und Pancreas von infizierten Babymäusen, aber auch von adoleszenten Mäusen eindeutige autoradiographische Signale auf (2-4 infizierte Zellen/Schnitt). Eine nähere Charakterisierung der infizierten Zelltypen wird zukünftig durch Verwendung von Paraffinschnitten erleichtert (Klingel et al. unveröffentlicht).

2.3.7 Gravidität CVB3 infizierter weiblicher Mäuse mit nachfolgender Untersuchung der Feten anhand der in situ Hybridisierung

Unter der Fragestellung, welche Beeinflussung die Fertilität der Mäuse durch die CVB3 Infektion erfährt und ob die Infektion auch diaplazentar übertragen wird, wurden Tiere beider Geschlechter nach der Infektion zusammen gehalten. Nach 21 Tagen wurden die drei graviden der fünf Weibchen euthanasiert und die Feten (ca. 20. Gravitätstag) in Ganzkörperschnitten mittels der in situ Hybridisierung auf Anwesenheit viraler RNA untersucht. Dazu wurden Querschnitte im Kopf- und Brustbereich sowie durch das Abdomen angefertigt, jedoch konnten in keinem der Körperabschnitte Hinweise auf eine Virusreplikation gefunden werden. Diese Befunde lassen vermuten, daß bei dieser Erkrankung in der Maus kein intrauteriner Infektionsweg existiert, wie er beispielsweise von der Enterovirusinfektion des Schweines bekannt ist (Rolle et al. 1984).

2.3.8 Verträglichkeitsstudie für die subkutane, intramuskuläre und intraperitoneale Applikation unterschiedlicher Dosen von rekombinantem murinem Interferon-gamma

Soweit Interferone in der Therapie am Menschen Einsatz finden, haben die hierbei pro Gewichtseinheit eingesetzten Dosen (ca $4 \cdot 10^4 \text{U/kg}$ - $2 \cdot 10^6 \text{U/kg}$ für rIFN) offensichtlich noch keinen therapeutischen Effekt in der Maus. So lehrt die Literatur Dosisangaben für die Maus in einer Variationsbreite von $1 \cdot 10^2 \text{U/g}$ bis zu $3 \cdot 10^5 \text{U/g}$ Maus (Stewart 1981, Matsumori 1987, Matsumori 1988, Gresser et al. 1984). Derartig hohe Dosen lassen jedoch ernstzunehmende Nebenwirkungen bei den Tieren befürchten, soweit man die Erfahrungen von der Anwendung beim Menschen zu Rate zieht (Wills et al. 1984). Bei intramuskulärer und subkutaner Verabreichung, wie sie für die Maus in Frage kommen, stellten sich auch vermehrte und länger andauernde Nebenwirkungen ein als bei der intravenösen Applikation des IFN. Es kommt hinzu, daß das Maximum des Interferonspiegels bei intramuskulärer sowie bei subcutaner Verabreichung zum einen langsamer erreicht wird und zum anderen niedriger ist als bei intravenöser Applikation (Wills et al. 1984). Um Sorge dafür zu tragen, daß unerwünschte toxische Nebenwirkungen des rekombinanten murinen Interferons im geplanten, nachfolgend zu besprechenden, Therapieversuch möglichst vermieden werden, wurde vorab eine Verträglichkeitsstudie für dieses IFN mit verschiedenen Dosen und Applikationsarten durchgeführt. In diesem Versuch wurden die verschiedenen Gruppen von Mäusen 4 Tage lang im Abstand von 24 Stunden nach folgenden Versuchsplan behandelt und anschließend getötet.

Tab. 3: Verträglichkeitsstudie für Interferon-gamma an Mäusen

IFN-Dosis	s.c.	i.m.	i.p.	
1:10 ⁵ U/20g	A 1	A 2	A 3	Gruppe A
2,5.10 ⁵ U/20g	B 1	B 2	B 3	Gruppe B
5.10 ⁵ U/20g	C 1	C 2	C 3	Gruppe C
PBS-Kontrolle	D 1	D 2	D 3	Gruppe D

Die abschließende histologische Untersuchung der Applikationsstelle sowie von Leber, Milz, Niere, Skelettmuskel und Herz ergab keine Hinweise, die in Zusammenhang mit den verschiedenen Applikationsarten und Dosen in Verbindung gebracht werden könnten.

2.3.9 Antivirale Aktivität von rekombinantem murinem Interferon-gamma in A.CA/Sn Mäusen nach Infektion mit CVB3

Die nach wie vor herrschende Unklarheit über die Pathogenese der CVB3 Infektion führte bis heute zu im wesentlichen zwei verschiedenen Theorien. Während im einen Fall Immunmechanismen durch zytotoxische T-Lymphozyten für die pathologischen Befunde verantwortlich gemacht werden (Woodruff and Woodruff 1974, Wong et al. 1977a, Wong et al. 1977b, Huber and Job 1983, Hashimoto et al. 1983, Guthrie et al. 1984, Huber et Lodge 1984, Gauntt et al. 1987, Estrin et al. 1987, Oldstone et al. 1988), liegt der zweiten Theorie die direkte, durch das Virus selbst verursachte Gewebsschädigung zugrunde. Zu dieser letzteren Anschauung führten Beobachtungen, nach denen Ausmaß und Schwere der Myokardveränderungen in direkter Korrelation zur Anwesenheit infektiöser Viruspartikel im Herzen stehen (Khatib et al. 1987). So bedingten beispielsweise Maßnahmen, die zu einem erhöhten Virustiter und einer verlängerten Viruspräsenz im Herzen führten, einen deutlich schwereren Krankheitsverlauf (Cortisonbehandlung, körperliche Anstrengung) (Kilbourne et al. 1956, Gatmaiton et al. 1970, Rager-Zisman & Allison 1973, Grun et al. 1984).

Diese Erfahrungen leiteten über zu der Überlegung, daß durch eine Eliminierung des Virus aus dem erkrankten Gewebe ein abgeschwächter Krankheitsverlauf mit anschließender Heilung erreicht werden könnte. Mit der Bestätigung dieser Theorie wäre die Voraussetzung für eine antivirale Therapie der viralen Herzerkrankung geschaffen. Erste Versuche an Zellkulturen mit IFN als antiviralem Agens folgten. Der Titer von infektiösem CVB3 in persistent infizierten humanen Herzfibroblasten konnte durch tägliche Behandlung mit humanem IFN-beta nicht nur erheblich reduziert, sondern innerhalb von 11-13 Tagen vollständig aus diesen Kulturen eliminiert werden. (Kandolf and Hofschneider 1985, Kirschner et al. 1986, Kandolf et al. 1987b). In einem weiteren Schritt lag nun ein Therapieversuch akut CVB3 infizierter, immunkompetenter Mäuse mit Interferon nahe. Die Durchführung eines solchen Experimentes ist jedoch an ein aussagefähiges Tiermodell gebunden, womit wiederum deutlich wird wie wertvoll die erfolgreiche Etablierung eines Modellsystems der viralen Myokarditis ist. Aufgrund der Speziespezifität der Interferone wurde rekombinantes murines Interferon gamma gewählt (Dijkmans et al. 1985). Der Versuchsplan sah, neben der zu therapierenden Tiergruppe drei Kontrollgruppen vor, um den Einfluß eines jeden Parameters (IFN, CVB3-Infektion, Injektionen) überprüfen zu können. Die statistische Mindestzahl an Tieren, die benötigt wird, um ein aussagefähiges Ergebnis zu erhalten, hängt einerseits von der Schwankungsbreite der im Vorfeld des Versuches gewonnenen Ergebnisse und andererseits von den erwarteten Erfolgen ab. Im vorliegenden Fall soll die Zahl der infizierten Zellen, ermittelt in der in situ Hybridisierung, (bzw. der Nekroseanteil in der pathologisch-histologischen Untersuchung) je Myokardschnitt bzw. je Herz als Maßstab für den therapeutischen Effekt des IFN herangezogen werden. Bei einer durchschnittlichen Anzahl von 30 autoradiographischen Signalen/Schnitt in den Vorversuchen und einer erwarteten zahlenmäßigen Reduktion dieser Signale um 30%, die gleich einer Reduktion der Virusreplikation gesetzt werden kann, ergab sich eine Mindestzahl von 15 zu therapierenden Mäusen. Der in den Vorversuchen festgestellte Nekroseanteil des Myokards lag in der entsprechenden Größenordnung, sodaß die gewählten Bedingungen auch für dieses Auswertungskriterium korrekt waren. Die Kontrollgruppen mußten aufgrund der äußerst schlechten Verfügbarkeit des IFN-gammas sowie auch der ausgewählten A.CA/Sn-Mäuse auf eine geringere, aber noch zulässige

Tierzahl begrenzt werden. Zu Beginn sowie am Ende des Versuches wurde das Körpergewicht aller Tiere bestimmt. Mit Ausnahme einer Maus der Positivkontrollgruppe konnten alle Tiere ihr Gewicht steigern oder zumindest konstant halten. Der Versuch beinhaltete 20 sechs bis neun Wochen alte A.CA/Sn-Mäuse (10 männliche, 10 weibliche), die mit 5×10^4 PFU CVB3 i.p. infiziert und acht Tage lang täglich mit 2×10^5 Units Interferon subkutan behandelt wurden, beginnend 72 Stunden post infectionem. Als Positivkontrollen wurden 14 A.CA/Sn-Mäuse gleichen Alters mit der identischen Dosis infiziert, als Negativkontrollen dienten sowohl zehn IFN-behandelte, nicht infizierte als auch fünf PBS-behandelte, nicht infizierte Mäuse. Am 11. Tag post infectionem wurden alle Mäuse getötet und das Herz steril entnommen. Alle Tiere der Positivkontrollgruppe zeigten pathologische makroskopische Befunde in Form einer Pericarditis in einem Fall und Verkalkungen unterschiedlichster Ausprägungen bei allen anderen Herzen. Mit Ausnahme des Anteiles, der für die histologische Untersuchung benötigt wurde, wurden pro Herz 20 bis 25 Gefrierschnitte angefertigt, die mit ^{35}S markierter cDNA-Sonde (beziehungsweise ^{35}S markierter p2732B Kontroll-DNA als Negativkontrolle) hybridisiert werden. Die praktische Ausführung dieser in situ Hybridisierung hätte jedoch leider den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit gesprengt, da das IFN erst sehr spät zur Verfügung stand. Somit waren neben der histologischen Untersuchung nur einige Vorversuche zur in situ Hybridisierung möglich, die erste Hinweise auf einen reduzierten Gehalt an viraler RNA im Myokard in Form einer Reduzierung der autoradiographischen Signale zeigen konnten.

Die histologische Untersuchung dagegen vermag den antiviralen Effekt des IFN-gamma mit signifikanten Ergebnissen zu belegen. Die 20 therapierten Mäuse zeigten eine deutliche Verminderung der Nekrosefelder, die sich nach morphometrischer Auszählung statistisch in einer Differenz von 52% gegenüber den unbehandelten infizierten Tieren darstellt (siehe Tab. 3). Die Gruppe B zeigte als Folge der unphysiologisch hohen IFN-Gaben ebenfalls geringe Nekrosen, wohingegen die PBS-behandelte Gruppe D einen physiologischen Befund aufwies.

Tab. 4: Morphometrische Auswertung des histologisch nachweisbaren
Nekroseanteiles im Myokard der vier Versuchsgruppen

Gruppe	Anzahl der Tiere n	durchschnittlicher Nekroseanteil
A	14	17%
B	10	2%
C	20	9%
D	5	0,9%

A = Positivkontrollgruppe, 7 männliche, 7 weibliche A.CA/Sn-Mäuse, mit 5×10^4 PFU infiziert

B = IFN-Kontrollgruppe, 5 männliche, 5 weibliche A.CA/Sn-Mäuse, 8 Tage lang mit 2×10^5 U/20g s.c. behandelt

C = Therapierte Tiere, 10 männliche, 10 weibliche A.CA/Sn-Mäuse, mit 5×10^4 PFU infiziert und 8 Tage lang mit 2×10^5 U/20g s.c. behandelt.

D = Negativkontrollgruppe, 3 männliche, 2 weibliche A.CA/Sn-Mäuse, 8 Tage lang mit 0,2ml PBS- s.c. behandelt.

Die Bestimmung des Nekroseanteiles erfolgte mit Hilfe eines genormten Zählgitters, das anhand der Befunde von Myokardschnitten definierter Dicke eine Berechnung der Ergebnisse für das gesamte Herzvolumen ermöglicht.

3. DISKUSSION

Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren zunächst ein äußerst vielfältiges Erscheinungsbild der murinen CVB3 Infektion. Durch die vergleichende Untersuchung der CVB3 Infektion des Herzens in den neun Inzuchtmäusestämmen gelang die Etablierung eines Mausmodelles der CVB3 induzierten humanen Myokarditis. Dieses Modellsystem bietet essentielle Voraussetzungen für ein detailliertes Studium der Pathogenitätsmechanismen dieser Erkrankung, vor allem durch die relativ hohe Inzidenz mit der beispielsweise innerhalb des A.CA/Sn-, A.SW/SnJ- oder des SWR/J-Stammes eine Myokarditis erzeugt werden konnte (bis zu 91%). Dem stehen in der Literatur beschriebene Mausmodelle gegenüber, in denen weniger als 50% der infizierten Tiere eine histologisch nachweisbare Entzündungsreaktion des Myokards aufweisen (Matsumori 1987, Buie et al. 1987, Khatib et al. 1987), und die aus diesem Grund nur bedingt für die wissenschaftliche Grundlagenforschung geeignet sind. Entweder muß die geringe Aussagekraft durch eine entsprechend höhere Tierzahl ausgeglichen werden, oder die mit Hilfe dieser Modelle erzielten Ergebnisse beinhalten einen gravierenden Unsicherheitsfaktor, der eine gesicherte Aussage in Frage zu stellen vermag.

Die mit den einzelnen Mäusestämmen in erster Linie mit Hilfe der in situ Hybridisierung erarbeiteten Resultate sind signifikant unterschiedlich und reichen, in Abhängigkeit vom Mäusestamm, von einem unauffälligen Befund des Myokards über gering- bis hin zu hochgradiger Infizierung der Herzen. Diese Beobachtungen gingen einher mit einem ebensogroßen Spektrum an histologischen Befunden. Mäusestämme, die eine Inzidenz der Myokarditis von 68% - 91% aufwiesen (SWR/J, A.CA/Sn, A.BY/SnJ, A.SW/SnJ) zeigten in der Regel einen sehr hohen Anteil virusinfizierter Myozyten pro Gewebeschnitt und gleichzeitig auch umfangreiche Nekrosefelder mit Kalzifizierung des Gewebes. Dabei korrelierten die Ergebnisse aus der in situ Hybridisierung weitgehend mit denen der Virusrückisolierung für die entsprechenden Proben. Dagegen traten gehäuft Fälle auf, in denen entweder Antikörper (gegen die viralen Hüllproteine und die Polymerase)

oder virale RNA, aber selten beides gemeinsam detektiert werden konnte. Die verbleibenden Stämme mit der Inzidenz von nur 23% - 31% (DBA/1J, DBA/2J, SJL/J, NuNu/NMR1) ließen dagegen kaum mehr als eine mäßige Infiltrierung des Gewebes mit Entzündungszellen und nachfolgender Fibrose erkennen. Die Virusreplikation war auf wenige einzelne infizierte Zellen je Schnitt beschränkt. Diese Ergebnisse legen eine genetische Steuerung des Krankheitsgeschehens vor allem der Empfänglichkeit für die Infektion nahe. In der Tat findet das Konzept einer genetischen Determination der Empfänglichkeit für eine virale Infektion allgemeine Zustimmung (Brinton et al. 1984, Wolfram et al. 1986, Herskowitz et al. 1987). Autoren, die sich dieser Problematik annahmen, stellten fest, daß in vielen Fällen zwei oder mehr Genorte darüber entscheiden, ob der Wirt-organismus resistent oder empfänglich für eine bestimmte Virusinfektion ist, wobei unter einem Genort wahrscheinlich ein einziges Gen zu verstehen ist. Jedoch wurden nur wenige dieser Resistenzgene innerhalb des MHC-Locus gefunden, so daß vermutlich von einer Beteiligung sowohl der Gene des MHC-Komplexes als auch von 'non-Mhc genes' an der Kontrolle der Wirtsempfänglichkeit für eine virale Infektion, wie vielfach in der Literatur beschrieben, auszugehen ist. (Bang 1978, Brinton et al. 1984, Gauntt et al. 1984, Wolfram et al. 1986, Herskowitz et al. 1987, Khatib et al. 1987, Buie et al. 1987).

In Einklang mit dieser Theorie belegen die im Rahmen vorliegender Arbeit gewonnenen Ergebnisse dieses Konzept einer genetischen Kontrolle der Empfänglichkeit. Im Vergleich der neun verschiedenen, teilweise H-2 congenen Inzuchtmäusestämme zeigten sich **stammspezifische** Erscheinungsbilder der Myokarditis sowohl in der Histologie als auch in der in situ Hybridisierung. Erläuternd sollte hinzugefügt werden, daß die congenen Mäusestämme als Ergebnis einer selektiven Kreuzung die Möglichkeit bieten, in Inzuchtlinien mit identischem Erbgut einzelne Allele zu verändern. Für die Verantwortlichkeit anderer, 'non-MHC genes', spricht auch die Tatsache, daß alle drei Mäusestämme mit dem gemeinsamen genetischen Hintergrund der A/J-Stämme (A.CA/Sn, A.BY/SnJ, A.SW/SnJ) eine ausgeprägte Myokarditis zeigen, trotz unterschiedlicher MHC-Haplotypen. Andererseits konnten keine übereinstimmenden Ergebnisse für Stämme mit gleichem MHC-Haplotyp beobachtet werden. So läßt das vollkommen ver-

schiedene Verhalten von SWR/J- (H-2^a) und DBA/1J-Stamm (H-2^a) und desgleichen von A.SW/SnJ- (H-2^s) und SJL/J-Stamm (H-2^s) einen Zusammenhang zwischen Genen des MHC-Komplexes und der CVB3 induzierten Myokarditis wenig wahrscheinlich erscheinen. Von entsprechenden Erfahrungen berichtete auch Wolfgram 1986: "**Differences between A.SW/SnJ (H-2^s) and B10.S/SgSf (H-2^s) suggested non Mhc-control of disease**". Man darf allerdings nicht außer acht lassen, daß man selbst innerhalb eines Mäusestammes kaum eine konstante Erfolgsrate bei der experimentell erzeugten viralen Myokarditis erreichen kann, da die Wirtsempfänglichkeit nach Aussagen einer Reihe von Autoren zusätzlich von Umweltfaktoren wie Infektionsdosis, Infektionsweg, Virulenz des Virusstocks (Trousdale et al. 1979, Cao et al. 1984), Immunsuppression (Kilbourne and Horsfall 1951, Gatmaiton et al. 1970, Woodruff and Kilbourne 1970, Rager-Zisman and Allison 1973) und Wirtsfaktoren wie Alter und Geschlecht der Tiere (Woodruff 1980, Lyden et al. 1987a, Lyden et al. 1987b) beeinflusst wird. Eigene Untersuchungen liefern unterschiedliche Beispiele hierfür. Eine Erhöhung der Infektionsdosis von 2×10^4 PFU auf 5×10^4 PFU bewirkte, entgegen anderslautenden Aussagen, bei Mäusestämmen, die vorab eine geringe Myokarditisinzidenz gezeigt hatten, eine Zunahme sowohl dieser Inzidenz als auch der infizierten Zellen pro Gewebeschnitt, während dieser Schluß beispielsweise für den A.BY/SnJ- oder den A.CA/Sn- Stamm nicht oder nicht in dem Maße gezogen werden konnte. Es entstand vielmehr der Eindruck, als wenn eine Erhöhung der Infektionsdosis die Empfänglichkeit dieser Mäusestämmen, relativ gesehen, weniger beeinflussen könnte als in den primär wenig permissiven Mäusestämmen. Verknüpfte man nun die Schlüsselrolle der genetischen Information mit der Nebenrolle der Infektionsdosis sowie der anderen Faktoren, so ergäbe sich ein Modellkonzept für die Regulation der Empfänglichkeit, in dem den einzelnen Stämmen sozusagen eine "Empfindlichkeitsschwelle" zugeordnet werden könnte. Sie läge beispielsweise bei den DBA/J-Stämmen oberhalb von 5×10^4 PFU und bei den A/J-Stämmen darunter.

Für das Infektionsalter und das Geschlecht der Mäuse konnte jedoch keine beeinflussende Funktion festgestellt werden. Aus den vorliegenden Untersuchungsergebnissen ist weder eine Abhängigkeit des Krankheitsgeschehens vom Geschlecht noch vom Alter der Tiere zu ersehen. Sie implizieren also eine eher untergeordnete Rolle dieser Faktoren. Dagegen wird der Immunsuppression subjektiven Erfahrungen zufolge größere Bedeutung beigemessen. Zumindest bezüglich der durch Streß bedingten Immunsuppression (hohe Besatzdichte, Rangordnungskämpfe vor allem unter männlichen Tieren, fehlerhaftes Klima), konnte eine Beeinflussung in Form einer Störung des Allgemeinbefindens im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet werden. Eine medikamentelle Immunsupprimierung war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht vorgesehen, wäre aber in zweierlei Hinsicht von Interesse. Zum einen bietet sie die Möglichkeit der Bestätigung und näheren Charakterisierung der genannten Beobachtung, zum anderen könnte eine gezielte immunsupprimierende Behandlung der wenig empfänglichen Mäusestämme einen Einblick in die Rolle von immunologischen Reaktionen auf Virusantigene und Autoantigene oder der Interferonproduktion in der Pathogenese der viralen Infektionserkrankung gewähren (Murphy and Glasgow 1968, Rytel 1969, Rager-Zisman and Allison 1973). Die Hemmung der antiviralen Aktivität des Interferons in humanen Herzfibroblasten durch Prednisolon darf wohl schon als erster Hinweis hierfür betrachtet werden (Kaidolf et al. 1987). Aus diesem Blickwinkel betrachtet, erscheint sogar die Tatsache, daß drei der acht untersuchten immunkompetenten Mäusestämme ein unbefriedigendes Ergebnis geliefert haben, von Vorteil zu sein. Ruft man sich an dieser Stelle noch einmal die oben diskutierte Modellvorstellung der "Empfindlichkeitsschwellen" für die einzelnen Mäusestämme in Erinnerung, könnte man hier eine Möglichkeit sehen, diese Theorie mit Hilfe einer immunsupprimierenden Behandlung zu prüfen.

Neben den oben erwähnten, vermuteten immunologischen Reaktionen sind mit Sicherheit noch eine Reihe weiterer Aspekte zu untersuchen, will man die Wirkungsmechanismen der Pathogenese der CVB3 induzierten Myokarditis aufzuklären versuchen. Ein möglicher Ansatz dazu beschreibt die direkte Schädigung des Gewebes durch das Virus selbst (Khatib et al. 1987). Eigene Untersuchungen hierzu beabsichtigten in einem ersten Schritt die akute

Phase der murinen CVB3 Infektion durch Interferon-gamma zu beeinflussen. Die infizierten Mäuse erhielten, beginnend 72 Stunden post infectionem, acht Tage lang täglich rekombinantes murines Interferon-gamma und entwickelten eine histologisch deutlich mildere Verlaufsform der Myokarditis mit einem um 52% verminderten Nekroseanteil gegenüber der infizierten Kontrollgruppe. Das bedeutet, daß Interferon gamma in der Lage war, der Schädigung und Zerstörung der Zellen entgegenzuwirken. Insofern ist es von größtem Interesse, diese Ergebnisse auch hinsichtlich des Einflusses von IFN-gamma auf die Virusreplikation durch die in situ Hybridisierung zu untersuchen. Erste vorläufige Ergebnisse hierzu, die auf eine Verminderung der Virusreplikation hinweisen, liegen bereits vor. Ferner bietet sich für die Zukunft auch eine kombinierte Anwendung verschiedener Interferone zur Ausnutzung des synergistischen antiviralen Effektes an (Fleischmann and Fleischmann 1984, Fleischmann et al. 1984a, Fleischmann et al. 1984b, Czarniecki et al. 1984, Oleszak and Stewart 1985, Sim and Cerruti 1987). Beachtung verdient aber vor allem auch die Beobachtung, daß die antivirale Aktivität des IFN nicht wie bisher meist nur bei präinfektioneller Applikation gezeigt werden konnte (Matsumori et al. 1987, Matsumori 1988), sondern noch 72 Stunden post infectionem wirksam ist, in einer Phase also, in der die Virämie bereits weitgehend beendet ist und die Organmanifestation schon eingesetzt hat. Diese Ergebnisse geben Anlaß, auf die Möglichkeit eines Einsatzes des IFN als antivirales Therapeutikum der viralen Herzerkrankung des Menschen zu hoffen.

In einem weiteren Schritt wurden Experimente unternommen, durch Untersuchung der chronischen Phase der Erkrankung einen Hinweis auf die Pathomechanismen der viralen Myokarditis zu erhalten. Erste Anzeichen sprechen für eine Persistenz viraler RNA in Zellen des Herzwebes. So wurden bei wenigen Tieren des SJL/L- und des DBA/2J-Stammes noch nach 90tägiger Infektionsdauer Signale in geringer Zahl (1-2/3 Schnitte) gefunden. Angesichts negativer Plasmidkontrollen sollte dies als möglicher Schritt hin zur Aufklärung der Pathogenese der viralen Herzerkrankung gedeutet werden, käme doch damit die Persistenz viraler RNA als Ätiologie der als Spätfolge einer viralen Myokarditis diskutierten Kardiomyopathie in Frage (Schölmerich 1975, Woodruff 1980, Reyes und Lerner 1985, Archard et

al. 1987, Kandolf 1988). Der für diese Arbeit vorgegebene Zeitraum erlaubte leider keine weiterführenden Untersuchungen zu diesem Aspekt, doch sollte meines Erachtens nach zukünftig gerade der chronischen Phase sowie der Übergangsphase der CVB3 induzierten Myokarditis im Sinne einer **persistenten Infektion** verstärkt Beachtung geschenkt werden. Bisher ist noch wenig über den Weg, den die CVB3 Infektion im Herzen nimmt, bekannt. Man geht davon aus, daß das Virus über Kapillaren und größere Gefäße des Blutkreislaufs in das Herz gelangt und zunächst in den Zellen der Gefäßendothelien repliziert (McManus et al.1987, Gauntt et al. 1987). Wie jedoch die Infektion die Myozyten erreicht, ob und welche Zelltypen außerdem betroffen sind, vermag bislang niemand sicher zu sagen. Hier bietet die in situ Hybridisierung die essentiellen Voraussetzungen zur Erforschung möglicher Zielzellen der CVB3 Infektion. Durch histologische Färbung mit Methylenblau-Azophloxin gelang in dieser Arbeit im Herzen einer 18 Tage lang infizierten DBA/2J-Maus der Nachweis infizierter interstitieller Zellen, bei denen es sich um Fibroblasten handeln könnte. Da ihr Auftreten bei kürzeren Infektionsspannen nicht beobachtet wurde, liegt die Vermutung nahe, daß der Infektionsweg des Virus vom Gefäßsystem über Myozyten zu den interstitiellen Zellen führt.

Um dies eingehend untersuchen zu können, müssen sich die einzelnen Zelltypen sicher voneinander differenzieren lassen. Das ist nur bei optimaler Strukturhaltung des Gewebes möglich. Gefrierschnitte, wie sie bei der in situ Hybridisierung verwendet werden, genügen diesen Anforderungen häufig nicht, so daß der Anlaß gegeben ist, auf andere Arten von Gewebeschnitten, beispielsweise auf Paraffinschnitte auszuweichen (Klingel et al. unveröffentlicht). Erste Erfolge liegen auch bereits vor. Als Vorteil der Paraffinschnitte ist vor allem die optimale Gewebserhaltung zu werten. Vom virologischen Standpunkt aus betrachtet, muß es zunächst verwundern, daß die virale RNA der Einbettung in Paraffin und sogar der Aufbewahrung bei Raumtemperatur standhalten kann, doch scheinen durch eine entsprechende Fixierung des Gewebes wie beispielsweise in PLP (Paraformaldehyd/Lysin/Phosphatpuffer) die nötigen Voraussetzungen dafür geschaffen zu sein.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Die virale Herzerkrankung des Menschen wird vor allem durch Coxsackieviren der Gruppe B verursacht. Die hochsensitive Methode der *in situ* Hybridisierung ermöglicht den direkten Nachweis dieser Erreger im erkrankten Gewebe. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, das Infektionsmuster der experimentell erzeugten, CVB3 induzierten Myokarditis in neun verschiedenen Inzuchtmäusestämmen, einschließlich einem immuninkompetenten Stamm zu vergleichen und ein Mausmodell der akuten Myokarditis zu etablieren. Dieses Modellsystem ermöglicht ein detailliertes Studium der Infektionsausbreitung im Herzen und der nach wie vor ungeklärten Pathogenese der Herzmuskelschädigung. Es wurde versucht, diese signifikant unterschiedlichen Erscheinungsbilder der murinen Myokarditis in Zusammenhang mit den MHC-Haplotypen der einzelnen Mäusestämmen zu bringen. Dabei stellte sich heraus, daß die Empfänglichkeit für die CVB3 Infektion wohl einer genetischen Kontrolle unterliegt, aber nicht direkt vom MHC-Komplex abhängig ist. Innerhalb der ersten zehn Tage der Infektion zeigten sich signifikante Unterschiede im Ausmaß der detektierbaren viralen RNA im Herzgewebe. Fünf der neun Mäusestämmen entwickelten eine schwere Myokarditis mit multifokalem Verteilungsmuster der Infektion. Die starke Virusreplikation ging einher mit ausgeprägter Nekrose der Herzmuskelfasern und nachfolgender Fibrosierung. Diese Ergebnisse legen eine direkte, durch das Virus selbst hervorgerufene Schädigung des Myokards nahe.

In einem erstmals durchgeführten Therapieversuch akut CVB3 infizierter immunkompetenter Mäuse mit rekombinantem murinem IFN-gamma konnte gezeigt werden, daß das IFN seine antivirale Aktivität auch bei schon manifester Infektion des Herzens zur Wirkung bringen kann. Dieser antivirale Effekt äußerte sich in einer histologisch nachgewiesenen 50%igen Reduzierung des Nekroseanteiles in den Herzen der therapierten Mäuse gegenüber den nicht behandelten, infizierten Kontrolltieren. Somit rechtfertigen diese vorliegenden Ergebnisse eine Fortführung und Weiterentwicklung von Therapieversuchen mit Interferonen. Es bleibt dann zu hoffen, daß sie auch dem Menschen in der postinfektionellen Therapie zum Vorteil gereichen.

Patterns of Infection of acute Coxsackievirus B3 Induced Myokarditis comparative In the Mouse Model

5. S U M M A R Y

Human viral myocarditis is primarily caused by coxsackievirus group B. A highly sensitive method to demonstrate the involvement of these viruses was introduced by in situ hybridization. This study was undertaken to compare the patterns of experimental CVB3 infection of eight different immunocompetent mouse strains in order to establish a mouse model of acute myocarditis by using this hybridization technique. Such a model system will facilitate a detailed examination of viral spread in heart tissue and the still uncertain pathologic process of myocardial fibre destruction. During the first ten days post infection the various mouse strains differed widely in the amount of detectable viral RNA in the hearts. Five of the eight strains developed severe myocarditis with multifocal distribution of the infected myocytes. Virus replication was mainly found in cells surrounded by marked muscle fibre necrosis and fibrosis which suggested a direct virus-induced tissue destruction as the mechanism of cardiac injury.

One attempt at explanation for these results tried to bring them into context with the genetic background of the different strains of mice. At least susceptibility for the CVB3 induced myocarditis seemed to be under genetic control but there were no events for any dependence on the MHC-complex.

For the first time an antiviral therapy with rIFN-gamma starting 72 hours post infection was undertaken. The results show a 50% reduction of heart muscle necrosis in comparison to the control group of animals. These data demonstrate the antiviral effect of IFN-gamma after infection has already established.

6. L I T E R A T U R

ABELMANN W.H.. 1973. Clinical aspects of viral cardiomyopathy. In Myocardial diseases. N.O.Fowler (ed.). New York and London. Pp. 253.

ARCHARD L.C., BOWLES N.E., OLSEN E.G., RICHARDSON P.J.. 1987. Detection of persistent coxsackie B virus RNA in dilated cardiomyopathy and myocarditis. In *European Heart Journal*. 8. (Suppl. J). Pp. 437-440.

BANG F.B.. 1978. Genetics of Resistance of animals to viruses. In *Advances in Virus Research*. 23. Academic Press, New York. Pp. 269-271, 277-279.

BLUM H.E., STOWRING L., FIGUS A., MONTGOMERY C.K., HAASE A.T., VYAS G.N.. 1983. Detection of Hepatitis B virus DNA in hepatocytes, bile duct epithelium, and vascular elements by in situ hybridization. In *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80. Pp. 6685-6688.

BRANCA A. and BAGLIONI C.. 1981. Evidence that Type I and II interferons have different receptors. In *Nature*. 294. Pp. 768-770.

BRINTON, M.A., BLANK J., NATHANSON N.. 1984. Host genes that influence susceptibility to viral disease. In *Notkins A.L. and Oldstone M.B.A., eds. Concepts in Viral Pathogenesis*. Springer-Verlag, New York, Pp.71-78.

BUIE C., LODGE P., HERZUM M., HUBER S.. 1987. Genetics of coxsackievirus B3 and encephalomyocarditis virus-induced myocarditis in mice. In *European Heart Journal*. 8. (Supplement J). Pp. 399-401.

BURKE D.C.. 1985. The interferons. In *British Medical Bulletin*. 4. Pp. 333-338.

CAO Y., SCHNURR D.P., SCHMIDT N.J.. 1984. Differing cardiotropic and myocarditic properties of group B type 4 coxsackievirus strains. In *Archives of Virology*. 80. Pp. 119-130.

CASELMANN W.H., EISENBURG J., HOFSCHEIDER P.H., KOSHY R.. 1988. Beta and gamma Interferon in chronic active hepatitis B: a pilot trial of short term combination therapy. In *Gastroenterology*. in press.

CELADA M.. 1988. The interferon gamma receptor. In *Lymphokine Research*. Vol. 7. 1. Pp. 61-73.

CLEMENS M., PAIN V., WONG S., HENSHAW E.. 1982. Phosphorylation inhibits guanine nucleotide exchange on eukaryotic initiation factor 2. In *Nature*. 296. Pp. 93-95.

COLLINS T., KORMAN A.J., WAKE C.T., BOSS J.M., KAPERSD.J., FIERIS W., AULT K.A., GIMBRONE M.A., STOWRINGER J.L., POBER J.S.. 1984. Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81. Pp. 4917-4921.

CROWELL R.L., FINKELSTEIN S.D., KUO-HOM LEE HSU, LANDAU B.J., STALHANDSKE P., WHITTIER P.S.. 1988. A murine model of coxsackievirus B3 induced acute myocardial necrosis for study of cellular receptors as determinants of viral tropism. Meeting abstract - New Concepts in Viral Heart Disease. Munich, May, 25th-28th 1988.

CROWTHER .R., ABU-EL ZEIN E.M.E.. 1979. Detection and quantification of foot and mouth-disease virus by enzyme labeled immunosorbent assay techniques. In *Journal of General Virology*. 42. Pp. 597-602.

CZARNIECKIE C.W., FENNIE C.W., POWERS D.B., ESTELL D.A.. 1984. Synergistic antiviral and antiproliferative activities of Escherichia coli-derived human alpha, beta, and gamma interferons. In *Journal of Virology*. 49. Pp. 490-496.

DALLDORF G., SICKLES G.M.. 1948. An unidentified filtrable agent isolated from the feces of children with paralysis. In *Science*. 108. Pp. 61-62.

DE GRADO W., WASSERMAN Z., CHOWDRY V.. 1982. Sequence and structural homologies among Typ I and Typ II interferons. In *Nature*. 300. Pp. 379-381.

DENHARDT D.T.. 1966. A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. In *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23. Pp. 641-646.

DIJKMANS R., VOLCKAERT G., VAN DAMME J., DE LEY M., BILLIAU A., DE SOMER P.. 1985. Molecular cloning of murine interferon gamma (muIFN-gamma) cDNA and its expression in heterologous mammalian cells. In *Journal of Interferon Research*. 5. Pp. 511-520.

ENGVALL E., PERLMANN P.. 1972. Enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA. In *Journal of Immunology*. 109. Pp. 129-135.

ERMOLIEVA Z.V., FURER N.M.. 1968. Experimental and clinical studies on Interferon and Interferon inducers. In *Proc. Microbiol. Res. Group Hung. Acad. Sci.* 2. Pp. 49.

ESTRIN M., HERZUM M., BULE C., HUBER S.A.. 1987. Immunosuppressives in murine myocarditis. In *European Heart Journal*. 8. (Suppl. J). Pp. 259-262.

FLEISCHMANN Jr. W.R. and FLEISCHMANN C.M.. 1984. Potentiating effect of murine interferon-gamma-containing lymphokine preparations on the antiviral and antiproliferative effects of murine interferon-alpha/beta: identification of the potentiation factor as murine interferon-gamma itself. In *Antiviral Research*. 4. Pp. 221-228.

FLEISCHMANN Jr. W.R., FLEISCHMANN C.M., FIERS W.. 1984a. Potentiation of interferon activity by mixtures of recombinant DNA-derived human interferons. In *Antiviral Research*. 4. Pp. 357-360.

FLEISCHMANN Jr. W.R., SCHWARZ L.A., FLEISCHMANN C.M.. 1984b. Requirement of interferon-gamma in potentiation of interferon's antiviral and anticellular activities: identity of mouse and human systems. In *Journal of Interferon Research*. 4. Pp. 265-274.

FRIEDMAN R., VOGEL S.. 1983. Interferons with special emphasis on the immun system. In *Adv.Immunol.* 34. Pp. 94-140.

GARDINER A.J.S., SHORT D.. 1973. Four faces of acute myocarditis. In *British Heart Journal.* 35. Pp. 433-442.

GATMAITON B.G., CHASON J.L., LERNER A.M.. 1970. Augmentation of the virulence of murine coxsackievirus B3 myocarditis by exercise. In *Journal of Experimental Medicine.* 131. Pp. 1121-1136.

GAUNTT C.J., GODENY E.K., LUTTON C.W., ARIZPE H.M., CHAPMAN N.M., TRACY S.M., REVTYAK G.E., VALENTE A.J., ROZEK M.M.. 1987a. In Kawai C., Abelmann W.H., Matsumori A. (ed.) *Cardiomyopathy Update 1. Pathogenesis of Myocarditis and Cardiomyopathy. Recent Experimental and Clinical Studies.* Tokyo: University of Tokyo Press. Pp. 341-374.

GAUNTT C.J., GOMEZ P.T., DUFFEY P.S., GRANT J.A., TRENT D.W., WITHERSPOON S.M., PAQUE R.E.. 1984. Characterization and myocarditic capabilities of coxsackievirus B3 variants in selected mouse strains. In *Journal of General Virology.* 2. Pp. 598-605.

GAUNTT C.J., LUTTON W.C., GODENY E.K., WITHERSPOON S.M., ARIZPE H.M., LANFORD R.E.. 1987b. Murine coxsackie virus B3 myocarditis. In *European Heart Journal.* 8. (Suppl. J). Pp. 393-397.

GOEDDEL D., LEUNG ., DULL T., GROSS M., LAWN R., McCADLISS P., SEEBURG P., ULLRICH A., YELLOVERTON E., GRAY P.. 1981. The structure of eight distinct cloned human leucocyte interferon cDNA. In *Nature.* 290. Pp. 20-26.

GRESSER I.. 1984. The effect of interferon on the expression of surface antigens. In: *Interferon, Vol. 2: Interferons and the immun system.* Vilcek and De Maeyer (eds.) Pp. 113-132. Elsevier science Publishers B.V., Amsterdam.

GROENEWEGEN G., BUURMAN W.A., VAN DER LINDEN C.J.. 1985. Lymphokine dependence of in vivo expression of MHC class II antigens by endothelium. In *Nature*. 316. Pp. 361-363.

GRUN J.B., SCHULTZ M., CROWELL R.L., LANDAU B.J.. 1984. Development of coxsackievirus B-3 induced myocarditis in the absence of specific cytotoxic T cell activity. In *American Society for Microbiology. Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology*. T22. Washington D.C.

GRUN J.B., SCHULTZ M., FINKELSTEIN S.D., CROWELL R., L., LANDAU B.J. 1988. Pathogenesis of acute myocardial necrosis in inbred mice infected with coxsackievirus B3. In *Microbiol. Pathogenesis*. 4. Pp. 417-430.

GUTHRIE M., LODGE P.A., HUBER S.A.. 1984. Cardiac injury in myocarditis induced by coxsackievirus group B type 3 in Balb/c mice is mediated by lyt 2+ cytolytic lymphocytes. In *Cellular Immunology*. 88. Pp. 558-567.

HAASE A., BRAHIC M., STOWRING L., BLUM H.. 1984. Detection of viral nucleic acids by in situ hybridization. In *Methods in Virology*. 7. Pp. 189-226.

HARPER M.E., MARSELLE L.M., GALLO R.C., WONG-STAAAL F.. 1986. Detection of lymphocytes expressing human T-lymphotropic virus type III in lymph nodes and peripheral blood from infected individuals by in situ hybridization. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83. Pp. 772-776.

HARTIG P.C., WEBB S.R.. 1986. Coxsackievirus B4 heterogeneity: effect of passage on neutralization and mortality. In *Acta Virol*. 30. Pp. 475-486.

HASHIMOTO I., TATSUMI M., NAKAGAWA M.. 1983. The role of T-lymphocytes in pathogenesis of coxsackievirus B3 heart disease. In *British Journal of Experimental Pathology*. 64. Pp. 497-504.

HAYWOOD A.M..1986. Patterns of persistent viral infections. In *New England Journal of Medicine*. 315. Pp. 939-948.

HENSON D., MUFSON M.A.. 1971. Myocarditis und pneumonitis with type 21 adenovirus infection: Association with fatal myocarditis and pneumonitis. In *Am. J. Dis. Child.* 121. Pp. 334-336.

HERSKOWITZ A., WOLFGRAM L., ROSE N.R., BEISEL K.W.. 1987. Coxsackievirus B3 murine myocarditis: a pathologic spectrum of myocarditis in genetically defined inbred strains. In *Journal of American College of Cardiology.* Vol. 9. 6. Pp. 1311-1319.

HILGERS J., VAN NIE R., IVANYI J., HILKENS J., MICHALIDES R., DE MOES J., POORT-KEESOM R., KROEZEN V., VON DEIMLING O., KOMINAMI R., HOLMES R.. 1985. Genetic differences in Balb/c sublines. In *Potter M, (ed.) The Balb/c mouse. Current Topics in Microbiology and Immunobiology.* Springer-Verlag. Berlin. 122. Pp. 19-30.

HIRANO T., YASUKAWA K., HARADA H., TAGA T., WATANABE Y., KASHIWAMURA S., NAKAJIMA K., KOYAMA K., IWAMATSU A., TSUNASAWA S., SAKIYAMA F., MATSUI H., TAKAHARA Y., TANGUCHI T., KISHIMOTO T.. 1986. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. In *Nature.* 324. Pp. 73-76.

HUBER S.A. and JOB L.P.. 1983. Cellular immune mechanisms in coxsackievirus group B3 induced myocarditis. In *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 161. Pp. 491-508.

HUBER S.A. and LODGE P.A.. 1984. Coxsackievirus B3 myocarditis in Balb/c mice: evidence for autoimmunity to myocyte antigens. In *American Journal of Pathology.* 116. Pp. 681-694.

INTERFERON NOMENCLATURE COMMITTEE. 1983. Interferon Nomenclature. In *Arch. Virol.* 77. Pp. 283-285.

ISAACS A., LINDENMANN J.. 1957. Virus interference. In *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.).* 147. Pp. 258-267.

JOHNSTON M., TORRENCE P.. 1984. The role of interferon induced proteins, double-stranded RNA and 2',5'-oligoadenylate in interferon mediated inhibition of viral translation. In Friedman (ed.) Interferon. Vol 3: Mechanisms of production and action. Pp. 189-298. Elsevier science Publishers B.V., Amsterdam.

KANDOLF R.. 1988a. The impact of recombinant DNA technology on the study of enteroviral heart disease. In Friedmann H. und Bendinelli M.. Cocksackieviruses.- A General Update. Eds. Plenum Publishing Corporation. New York.

KANDOLF R.. 1988b. Virale Herzerkrankung: Etablierung einer neuen hochsensitiven Diagnostik der Virusinfektion des Myokards mittels rekombinanter DNA Technologie. Habilitationsschrift. Ludwig-Maximilians Universität München.

KANDOLF R., AMEIS D., KIRSCHNER P., CANU A., HOFSCHEIDER P.H.. 1987a. In situ detection of enteroviral genomes in myocardial cells by nucleic acid hybridization: An approach to the diagnosis of viral heart disease. In Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 84. Pp. 6272-6276.

KANDOLF R., CANU A., HOFSCHEIDER P.H.. 1985. Cocksackie B32 virus can replicate in cultured human heart cells and is inhibited by interferon. In J. Mol. Cell. Cardiol. 17. Pp. 167-181.

KANDOLF R., HOFSCHEIDER P.H.. 1985. Molecular cloning of the genome of a cardiotropic Cocksackie B3 virus: Full-length reverse-transcribed recombinant cDNA generates infectious virus in mammalian cells. In Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82. Pp. 4818-4822.

KANDOLF R., KIRSCHNER P., AMEIS D., CANU A., HOFSCHEIDER P.H.. 1986. Etablierung einer neuen hochsensitiven Diagnostik der Virusinfektion des Myokards durch in situ- DNA/RNA-Hybridisierung. Z. Kardiol. 75. Suppl. 1, Pp. 57.

KANDOLF R., KIRSCHNER P., AMEIS D., CANU A., HOFSCHEIDER P.H.. 1987. Cultured human heart cells: A model system for the study of the anti-viral activity of interferons. In European Heart Journal. (Suppl. J) 8. Pp. 293-318.

KATZE M.G., CROWELL R.L.. 1980. Immunological studies of the group B coxsackieviruses by the sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoprecipitation. In *Journal of General Virology*. 50. Pp. 357-367.

KAWAI C., TOMIOKA N., MATSUMORI A., KISHIMOTO C.. 1987. Steroid treatment in viral myocarditis in mice: with special reference to serial changes in lymphocyte subsets. In *European Heart Journal*. 8. (Suppl. J). Pp. 257-258.

KHATIB R., PROBERT A., REYES M.P., KHATIB G., CHASON J.L.. 1987. Mouse strain-related variation as a factor in the pathogenesis of coxsackie-virus B3 murine myocarditis. In *Journal of General Virology*. 68. Pp. 2981-2988.

KILBOURNE E.D., HORSFALL F.L.. 1951. Lethal infection with coxsackie virus in adult mice given cortisone. In *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 77. Pp. 135-138.

KILBOURNE E.D., WILSON C.B., PERRIER D.. 1956. The induction of gross myocardial lesions by a coxsackie (pleurodenia) virus and cortisone. In *Journal of Clinical Investigation*. 35. Pp. 362-370.

KIRSCHNER P., KANDOLF R., AMEIS D., CANU A., HOFSCHEIDER P.H.. 1986. Prednisolon hemmt die antivirale Aktivität von Interferon-beta in Coxsackie B3 Virus infizierten humanen myokardialen Fibroblasten. In *Z. Kardiol.* 75. (Suppl.1). P. 65.

LABDON J., GIBSON K., SUN S., PESTKA S.. 1984. Some species of human leukocyte interferon are glycosylated. In *Arch. Biochem. Biophys.* P. 232, 244

- LERNER A.M., WILSON F.M.. 1973. Virus myocardiopathy. in *Prog. Med. Virol.* 15. Pp. 63-91.
- LINDENMANN J., ISAACS A., BURKE D.C.. 1957. Studies on the production, mode of action and properties of Interferon. In *Brit. J. Exp. Path.* 38. Pp. 551-562.
- LYDEN D., OLSZEWSKI J., HUBER S.. 1987a. Variation in susceptibility of Balb/c mice to coxsackievirus group B type 3 -induced myocarditis with age. In *Cellular Immunology*. 105, Pp.332-339.
- LYDEN D., OLSZEWSKI J., HUBER S.A.. 1987b. Influence of sex hormones on coxsackie virus group B, type 3 induced myocarditis in balb/c mice. In *European Heart Journal*. 8. (Suppl. J). Pp. 389-391.
- MATSUMORI A., M.D.. 1987. Experimental animal models of viral myocarditis. In *European Heart Journal*. 8. (Supplement J). Pp. 383-388.
- MATSUMORI A., M.D.. 1988. Protective effect of recombinant alpha interferon on coxsackievirus B3 myocarditis in mice. In *American Heart Journal*. 115. Pp 1229-1232.
- MATSUMORI A., KAWAI C.. 1980. Coxsackievirus B3 perimyocarditis in Balb/c mice: experimental model of chronic perimyocarditis in the right ventricle. In *Journal of Pathology*. Vol. 131. Pp. 97-106.
- MATSUMORI A., CLYDE P., CRUMPACKER S., ABELMANN W.H.. 1987. Prevention of viral myocarditis with recombinant human leukocyte Interferon alpha A/D in a murine model. In *Journal of American College of Cardiology*. 9. Pp. 1320-1325.
- MAY M., HELFGOTT D., SEHGAL P.. 1986. Anti-beta-Interferon antibodies inhibit the increased expression of HLA B7 mRNA in tumor necrosis factor-treated human fibroblasts: Structural studies of the beta 2 interferon involved. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83. Pp. 8957-8961.

McMANUS B.M., GAUNTT C.J., CASSLING R.S.. 1987. Immunopathologic basis of myocardial injury. In *Cardiovasc. Clin.* 18. Pp. 163-184.

MELNICK J.L., WENNER H.A., PHILLIPS C.A.. 1979. Enteroviruses. In *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections.* Lennette E.H. and Schmidt N.J.. 5 edn. Eds. Pp. 471-534. Washington: American Public Health Association.

MINNICH L., RAY G.. 1980. Variable susceptibility of mice to group B coxsackievirus infection. In *Journal of Clinical Microbiology.* 11. Pp. 73-75.

MUNOZ A., CARRASCO L.. 1984. Action of human lymphoblastoid interferon on HeLa cells infected with RNA-containing animal viruses. In *Journal of General Virology.* 65. Pp. 377-390.

MURPHY B.R., GLASGOW L.A.. 1968. Factors modifying host resistance to viral infection. III. Effect of whole body X irradiation on experimental encephalomyocarditis virus infection in mice. In *Journal of Experimental Medicine.* 27. Pp. 1035-1052.

NEUMANN-HAEFELIN D., SHRESTHA B MANTHEY K.F.. 1976. Effective anti-viral prophylaxis and therapy by systemic application of human Interferon in immunosuppressed monkeys. In *J. Infect. Dis.* 133. Pp. A211-A215.

OLDSTONE M.B.A., SALVATO M., TISHON A., LEWICKI H.. 1988. Virus-Lymphocyte Interactions: III. Biologic parameters of a virus variant that fails to generate CTL and establishes persistent infection in immunocompetent hosts. In *Virology.* 164. Pp. 507-516.

OLESZAK E., STEWART II. W.E.. 1985. Potentiation of the antiviral and anticellular activities of interferons by mixtures of HuIFN-gamma and HuIFN-alpha or HuIFN-beta. In *Journal of Interferon Research.* 5. Pp. 361-371.

PAPPENHEIMER A.M., DANIELS J.B., CHEEVER F.S., WELLER T.H.. 1950. Lesion caused in suckling mice by certain viruses isolated from cases of so called nonparalytic poliomyelitis and of pleurodynia. In *J. Exp. Med.* 92. Pp. 169-190.

PAUKER K., CANTELL K., HENLE W.. 1962. Quantitative studies on viral interference in suspended L-cells. III. Effect of interfering viruses and interferon on growth rate of cells. In *Virology*. 17. 324-334.

PISCHEDDA F., KIRCHNER H., LEANDERSON T.. 1987. The role of gamma Interferon in B-cell activation. In *Scandinavian Journal of Immunology*. 25. Pp. 315-318.

PRABHAKAR B.S., HASPEL M.V., McCLINTOCK P.R., NOTKINS A.L.. 1982. High frequency of antigenic variants among naturally occurring human Coxsackie B4 virus isolates identified by monoclonal antibodies. In *Nature*. 300. Pp. 374-376.

RAGER-ZISMAN B., ALLISON A.C.. 1973a. The role of antibody and host cells in the resistance of mice against infection by coxsackie B-3 virus. In *Journal of General Virology*. 19. Pp. 329-338.

RAGER-ZISMAN and ALLISON A.C. 1973b. Effects of immunosuppression on coxsackie B3 virus infection in mice, and passive protection by circulating antibody. In *Journal of General Virology*. 19. Pp. 339-351.

REYES M.P. and LERNER A.M.. 1985. Coxsackievirus Myocarditis - with special reference to acute and chronic effects. In *Progress in Cardiovascular Diseases*. Vol. 27. 6. Pp 373-394.

RIECKER G. 1982. *Klinische Kardiologie*. Pp. 138-144. Springer Verlag, Berlin.

ROLLE M., BACHMANN P.A., GEDEK B., MAHNEL H., MAYR A., SCHELS H.. 1984. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Enke-Verlag, Stuttgart.

RUBINSTEIN M., ORCHANSKY K.. 1985. The interferon receptor. In *CRC Critical Reviews in Biochemistry*. Vol 21. Issue 3. Pp.249-275.

RYTEL M.W.. 1969. Interferon response during coxsackie B3 infection in mice. In *Journal of Infectious Diseases*. 120. Pp. 379-382.

RYTEL M.W. and Kilbourne E.D.. 1971. Differing susceptibility of adolescent and adult mice to non-lethal infection with coxsackievirus B3. In *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137. Pp. 443-448.

SAKIKABARA S., KONNO S.. 1962. Endomyocardial biopsy. In *Japanese Heart Journal*. 3. Pp. 537-543.

SCHATTNER A.. 1988. Review: Interferons and Autoimmunity. In *The American Journal of Medical Sciences*. 6. 532-544.

SCHÖLMERICH P., 1975. Diagnostik und Verlauf der Virusmyokarditis. In *Internist*. 16. Pp. 508-519.

SCHÖNKE H.. 1988. Generierung monoklonaler Antikörper gegen Coxsackievirus B3 Proteine. Diplomarbeit. Justus-Liebig-Universität Giessen.

SEN G.. 1982. Mechanisms of interferon action: progress towards its understanding. In *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 27. Pp. 105-156.

SEN G.. 1984. Biochemical pathways in interferon action. In *Pharmac. Ther.*. Vol. 24. Pestka (ed.). Pp. 235-257. Pergamon Press.

SIM I.S., CERRUTI R.L.. 1987. Recombinant interferons alpha and gamma: comparative antiviral activity and synergistic interaction in encephalomyocarditis virus infection of mice. In *Antiviral Research*. 8. Pp. 209-221.

STEWART W.E.II.. 1981. *The Interferon System*. New York, N.Y.

TANIGUCHI T., MANTEI N., SCHWATZSTEIN M., WEISSMANN C.. 1980. Human leukocyte and fibroblast interferons are structurally related. In *Nature*. 285. Pp. 547-549.

TRINCHIERI G., PERUSSIA B.. 1985. Immune interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects. In *Immunology Today*. 6. Pp. 131-136.

TROUSDALE M.D., PAQUE R.E., NEALON T., GAUNTT C.J.. 1979. Assessment of coxsackievirus B3 ts mutants for induction of myocarditis in a murine model. In *Infection and Immunity*. Vol. 23. 2. Pp. 486-495.

WALLACH D., FELLOUS M., REVEL M.. 1982. Preferential effects of gamma-Interferon on the synthesis of HLA-antigens and their mRNA in human cells. In *Nature*. 299. Pp. 833-836.

WILLS R.J., DENNIS S., SPIEGEL H.E., GIBSON D.M., NADLER P.I. 1984. Interferon kinetics and adverse reactions after intravenous, intramuscular, and subcutaneous injection. In *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. Vol. 35. 5. Pp. 722-727.

WILSON F. and LERNER A.. 1979. A cardiomyopathy of Balb/c mice, superimposed infection of coxsackie B3. In *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 157. Pp. 442-448.

WOLFGAM L.J., BEISEL K.W., HERSKOWITZ A., ROSE N.R. 1986. Variations in the susceptibility to coxsackievirus B3 induced myocarditis among different strains of mice. In *Journal of Immunology*. 136. Pp 1846-1852.

WONG C.Y., WOODRUFF J.J., WOODRUFF J.F.. 1977. Generation of cytotoxic T lymphocytes during coxsackievirus B3 infection: I. Model and viral specificity. In *Journal of Immunology*. 118. Pp. 1159-1164.

WONG C.Y., WOODRUFF J.J., WOODRUFF J.F.. 1977. Generation of cytotoxic T lymphocytes during coxsackievirus B3 infection: II. Characterization of effector cells and demonstration of cytotoxicity against viralinfected myofibers. In *Journal of Immunology*. 118. Pp. 1165-1169.

WOODRUFF J.F.. 1980. Viral myocarditis: A review. In *American Journal of Pathology*. 101. Pp 426.

WOODRUFF J.F., KILBOURNE E.D.. 1970. The influence of quantitated post weaning undernutrition on coxsackievirus B3 infection of adult mice. I.

Viral persistence and increased severity of lesions. In *Journal of Infectious Diseases*. 121. Pp. 137-163.

WOODRUFF J.F., WOODRUFF J.J. 1974. Involvement of T-Lymphocytes in the pathogenesis of coxsackievirus B3 heart disease. In *Journal of Immunology*. 113. Pp. 1726-1734.

WYNNE J., BRAUNWALD E. 1980. The cardiomyopathies and myocarditis. In *Heart Disease. A textbook of cardiovascular medicine*. Braunwald E. (ed.). Pp. 1437-1498. W.B.Saunders. Philadelphia.

D a n k s a g u n g

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof.Dr.Dr.h.c.mult A.Mayr für sein Interesse und die Vertretung vorliegender Arbeit vor dem Promotionsausschuß der Tierärztlichen Fakultät sowie

Herrn Prof.Dr.Dr. P.H. Hofschneider für die Möglichkeit, diese Arbeit anfertigen zu können wie auch für die damit verbundenen Bemühungen.

Außerdem danke ich Herrn Priv.Doiz.Dr. R.Kandolf für die mir jederzeit gewährte Gesprächsbereitschaft und die wertvollen Ratschläge, die meine Arbeit erleichterten. Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Priv.Doiz.Dr. G.Mall sowie Frau Dr. Karin Klingel für die großzügige Unterstützung und die ausgezeichnete Zusammenarbeit bei der Untersuchung der Vielzahl meiner Proben bedanken. Mein Dank gilt auch Frau Heike Schöнке und Frau Helga Riesemann für ihre tatkräftige Mithilfe bei der Etablierung und Durchführung des ELISAs.

Bei allen Mitarbeitern der Abteilung für Virusforschung möchte ich mich für die Kollegialität und die mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft bedanken.

Ganz besonderer Dank gebührt meinem Ehemann Robert, der mit unendlicher Geduld und Fürsorge sehr viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

LEBENS LAUF

- 20.07.1963 geboren in Zöschingen, Landkreis Dillingen
a.d. Donau als Tochter des am 24.04. 1986 ver-
storbenen Landwirtes Philipp Schön und seiner
Ehefrau Luise Wilhelmine Schön, geb. Hubele.
- 1969 - 1973 Besuch der Grundschule in Zöschingen und
Bachhagel
- 1973 - 1982 Besuch des Hellensteingymnasiums in Heidenheim
a. d. Brenz.
- 27.05. 1982 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
- ab WS 1982 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maxi-
milians Universität in München
- SS 1983 Naturwissenschaftlicher Abschnitt der
Tierärztlichen Vorprüfung
- WS 1984 Anatomisch-physiologischer Abschnitt der
Tierärztlichen Vorprüfung
- WS 1985 Erster Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung
- SS 1986 Zweiter Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung
- 17.07.1987 Heirat mit dem Studenten der Politikwissenschaften
Robert Michel
- SS 1987 -
WS 1987 Dritter Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung

22.12. 1987 III. Staatsexamen

10.02. 1988 Approbation als Tierärztin

seit

01.02. 1988 Promotionsarbeit in der Abteilung für
Virusforschung des Max-Planck-Institutes
für Biochemie in Martinsried

